

**Tissue Engineering (Gewebezucht) von Herzklappen
als Aortenklappenersatz
Histomorphologische Charakterisierung nach heterotoper
Implantation in die Systemzirkulation des Schafes**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Thomas Schulz
geboren am 03. Juli 1980 in Forst (Lausitz)

10. Mai 2006

Erster Gutachter: PD Dr. U. A. Stock, Berlin
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K.-J. Halbhuber, Jena
Dritter Gutachter: Prof. Dr. H. Mertsching, Stuttgart

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.02.2007

Abkürzungsverzeichnis

α –SMA	α -Smooth Muscle Actin (glattmuskuläres Aktin)
A.	Ateria
DAPI	4',6-Diamindino-2-Phenylindol
ECM	extrazelluläre Matrix
ENOS	Endotheliale NO Synthetase
EZ	Endothelzellen
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälber Serum)
FGF	Fibroblast Growth Faktor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
HE	Hematoxylin-Eosin
MF	Myofibroblasten
MMP's	Matrix-Metalloproteinasen
Op	Operation
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platlet-Derived-Growth-Factor
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie

Superfic.	superficialis
TE	Tissue Engineering
TE-Klappe	Tissue engineerte Herzklappe
s. Abb.	siehe Abbildung
s. Tab.	siehe Tabelle
SEM	Scanning Elektronen Mikroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIMP's	Tissue inhibitors of metalloproteinases
vWF	von Willebrandt Faktor

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
INHALTSVERZEICHNIS	3
ZUSAMMENFASSUNG	6
1. EINLEITUNG	8
1.1 Das Herz	8
1.2 Aufbau und Struktur der Herzklappen	9
1.2.1 Zelluläre Komponenten der Herzklappen	9
1.2.1.1 Interstitielle Klappenzenellen	9
1.2.1.2 Endokardiale Klappenzenellen (Herzklappenendothel)	11
1.2.2 Extrazelluläre Komponenten der Herzklappen	12
1.2.2.1 Schichtweiser Aufbau der Aortenklappe	13
1.3 Erkrankungen der Herzklappen	15
1.4 Möglichkeiten des Herzklappenersatzes	16
1.5 Tissue Engineering von Herzklappen	19
1.5.1 Mögliche Zellpopulation für das Tissue Engineering von Herzklappen	20
1.5.2 Grundgerüste für das Tissue Engineering von Herzklappen	20
1.5.3 Signale und Kulturbedingungen	23
1.6 Konzept zur Herstellung eines autologen Aortenklappenersatzes	24
2. ZIELE DER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG	26
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Versuchstiere	27
3.2 Herstellung der Herzklappen	27
3.2.1 Übersicht über verwendete Materialien und Chemikalien	28

3.2.2 Zellisolation und -kultivierung	29
3.2.2.1 Isolation der Endothelzellen	29
3.2.2.2 Isolation der Myofibroblasten mit Hilfe der Explant-Methode	30
3.2.2.3 Passage der Zellen	31
3.2.2.4 Einfrieren der Zellen	31
3.2.2.5 Auftauen der Zellen	31
3.2.3 Dezellularisierung der Herzklappen	31
3.2.4 Besiedlung der Herzklappen	33
3.3 Operative Verfahren	35
3.3.1 Gefäßentnahme	35
3.3.2 Implantation	36
3.3.3 Explantation	39
3.4 Untersuchungen	40
3.4.1 Probenvorbereitung für Scanning Elektronen Mikroskopie (SEM)	40
3.4.2 Probenvorbereitung für Histologie und Immunhistochemie	40
3.4.3 Histologische Färbungen	41
3.4.4 Immunhistochemie	41
4. ERGEBNISSE	44
4.1 Versuchsverlauf	44
4.2 Sonographische Beurteilung der Implantate	45
4.3 Makroskopische Beurteilung der Präparate	45
4.4 Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung der Präparate	47
4.5 Histologische und immunhistochemische Beurteilung	49
4.5.1 Allgemeiner morphologischer Überblick	49
4.5.2 Beurteilung der zellulären Besiedlung und allgemeinen Morphologie	49
4.5.3 Beurteilung der extrazellulären Matrixbestandteile	54
4.5.4 Phänotypische Charakterisierung der zellulären Bestandteile	59
4.5.5 Darstellung von Verkalkungen innerhalb der Präparate	61

5. DISKUSSION	63
5.1 Biomechanische Stabilität der Klappen	63
5.2 <i>In vivo</i> Remodelling der Tissue Engineerten Herzklappen	64
5.3 Rolle des Endothels für Thrombenbildung und Verkalkung	67
5.4 Bildung von Neointima	69
5.6 Diskussion des gewählten Tiermodells	71
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	74
7. LITERATURVERZEICHNIS	76
ANHANG	93
Lebenslauf	93
Danksagung	94
Ehrenwörtliche Erklärung	96

Zusammenfassung

Die Verwendung biologischer oder mechanischer Prothesen zum Ersatz erkrankter oder geschädigter Herzklappen ermöglicht eine weitgehende Wiederherstellung der Klappenfunktion. Jedoch verfügt keines der derzeit verwendeten Klappenmodelle über eine ausreichende, längerfristige Biokompatibilität, Fähigkeit zur Selbstreparatur oder entsprechendes Potential zum Wachstum und Remodelling. Eine vielversprechende Strategie zur Überwindung dieser Limitationen stellt das kardiovaskuläre Tissue Engineering dar. Ziel ist die Herstellung eines lebenden, wachstums- und reparaturfähigen Herzklappenersatzes. In den letzten Jahren wurden zu diesem Zweck verschiedene Strategien entwickelt. Mit dem Einsatz von Tissue engineerten Herzklappen innerhalb der Pulmonalstrombahn konnten bereits vielversprechende Erfolge erzielt werden. Der überwiegende Teil der Herzklappeneingriffe wird jedoch an der Aortenklappe durchgeführt. Deshalb ist die Herstellung einer vitalen Herzklappe, die für den Einsatz in der Hochdruckzirkulation geeignet ist, klinisch von großer Bedeutung. Ein vielversprechendes Konzept zur Herstellung einer solchen Klappe ist die *in vitro* Konditionierung dezellularisierter und mit autologen Gefäßzellen rebesiedelter Pulmonalklappen vom Schwein. Durch die Applikation dosierter Scherkräfte mittels pulsatilem Fluss konnten Klappen hergestellt werden, die in ihren morphologischen und mechanischen Eigenschaften einer Aortenklappe ähnelten. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Konzept erstmals in der Systemzirkulation des Schafes getestet.

Myofibroblasten (MF) und Endothelzellen (EZ) wurden aus einem Segment der A. carotis des jeweiligen Versuchstieres gewonnen. Ferkelklappen wurden mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung dezellularisiert und mit den gewonnenen MF zwei Tage unter statischen Bedingungen besiedelt. Anschließend wurden die Klappen 16 Tage in ein Bioreaktorsystem eingebracht, wo sie pulsatilen Scherkräften ausgesetzt wurden. Eine nachfolgende 2-tägige Kulturphase unter statischen Bedingungen, in der die EZ aufgebracht wurden, komplettierte die Rebesiedlung. Auf diese Weise wurden die Klappen für 6 Versuchstiere hergestellt. Jeweils zwei weitere Kontrollklappen wurden nur mit MF oder nur mit EZ besiedelt. Die fertigen Klappen wurden in heterotoper Position in die Aorta descendens des jeweiligen Versuchstieres für eine Dauer von 1, 2 und 3 Monaten implantiert und anschließend durch makroskopische Beurteilung, Rasterelektronenmikroskopie, Histologie und

Immunhistochemie in Bezug auf ihre zellulären und extrazellulären Strukturen charakterisiert.

Die Eingriffe wurden von allen Versuchstieren überlebt. Ein Versuchstier verstarb wenige Stunden nach der Implantation aufgrund eines Risses im Bereich der Klappe, ein weiteres aufgrund pulmonaler Komplikationen. Die entnommenen Klappen dieser Tiere zeigten einen feinen Thrombensaum entlang der gesamten luminalen Implantatsflächen. Die Klappen der übrigen Tiere konnten zu den ursprünglich geplanten Terminen entnommen werden. Eine Bewegung der Taschen war zum Zeitpunkt der Explantation mittels Ultraschalluntersuchung nicht mehr nachweisbar. Die mit MF und EZ besiedelten Präparate waren frei von Thromben. Die Taschen der Klappen schienen makroskopisch verdickt, verkürzt und degeneriert. Histologisch war die ehemalige Tasche, die in eine massive Neointima eingehüllt war, noch deutlich zu erkennen. Nach einem Monat *in vivo* war die Struktur der ehemaligen Tasche noch sehr gut erhalten und das Taschenstroma zeigte eine kontinuierliche Besiedlung mit vitalen Zellen. Mit fortschreitender Implantationsdauer trat jedoch eine zunehmende Fibrosierung und paralleler Zellverlust auf. In den peripheren Präparatsbereichen zeigten sich Kapillareinsprossungen und lymphozytäre Zellinfiltrate. Die nur mit EZ besiedelten Präparate zeigten ein ähnliches Bild. Die Taschen der nur mit MF besiedelten Klappen waren überwiegend von thrombotischem Material eingehüllt und zeigten massive Verkalkungsherde.

Die Immobilisation der Klappen ist wahrscheinlich durch eine massive Neointimabildung verursacht. Der beobachtete Thrombensaum bei den vorzeitig verstorbenen Tieren kann als Zeichen einer, in der Frühphase bestehenden, Endothelinsuffizienz gedeutet werden. Eine intakte Endothelschicht trägt entscheidend zur Verhinderung thrombotischer Prozesse und Verkalkungen bei. Aber auch im Zusammenhang mit der Neointimabildung scheint ihr eine wichtige Rolle zuzukommen. Für zukünftige Versuche müssen Strategien entwickelt werden, um eine suffiziente Endothelschicht zu etablieren. Eine Besiedlung der Klappen mit EZ unter statischen Bedingungen scheint für die Anforderung innerhalb der Hochdruckzirkulation nicht ausreichend. Weitere Versuche sollten sich vorerst auf kurze Implantationszeiträume beschränken, um die in der Frühphase ablaufenden Prozesse besser zu erfassen.

1. Einleitung

1.1 Das Herz

Das menschliche Herz ist das zentrale Organ in unserem Blutkreislauf und funktioniert als Druck- und Saugpumpe, die pro Minute etwa 5 bis 6 Liter Blut durch den Körper pumpt. Das Herz befindet sich im Mediastinum hinter dem Sternum und liegt im "Herzbeutel", der durch die beiden Blätter des Perikards gebildet wird. Der größte Teil der kardialen Masse wird durch die Herzmuskulatur (Myokard) gebildet, die zum Lumen hin mit Endokard ausgekleidet ist. Anatomisch besteht das Herz aus vier Höhlen, zwei Vorhöfen (Atrien) und zwei Kammern (Ventrikel). Man unterscheidet eine linke und eine rechte Herzhälfte, die durch das Vorhof- bzw. Kammerseptum voneinander getrennt sind. Das menschliche Herz besitzt vier Herzklappen die sich aus Endokardaussackungen gebildet haben. Sie erfüllen eine ventilartige Funktion und sorgen während der Herzaktionen für einen geordneten, unidirektionalen Ein- und Ausfluss des Blutes zwischen den Binnenräumen des Herzens und den herznahen Blutgefäßen. Die Klappen zwischen Vorhöfen und Herzkammern werden ihrer Gestalt nach als Segelklappen oder alternativ, unter Betrachtung ihrer Funktionalität, auch als Atrioventrikularklappen bezeichnet. Die Klappe zwischen dem rechten Vorhof und der linken Kammer ist die Trikuspidalklappe. Der linke Vorhof wird vom linken Ventrikel durch die Mitralklappe getrennt. Die Segelklappen verhindern, daß Blut in die Vorhöfe zurückgepumpt wird, wenn sich die Herzkammern während der Systole kontrahieren. Die zwischen Kammer und der jeweiligen Ausstrombahn gelegenen Klappen werden wegen ihres charakteristischen Aufbaus als Taschenklappen bezeichnet. Dabei unterscheidet man die zwischen rechter Kammer und Trunkus pulmonalis gelegene Pulmonalklappe und die zwischen linker Kammer und Aorta gelegene Aortenklappe. Sie verhindern, dass Blut aus der Pulmonalarterie und der Aorta in die jeweilige Herzkammer zurückfließt, wenn sich die Ventrikel durch Muskelerschlaffung während der Diastole wieder erweitern. Sauerstoffarmes, venöses Blut gelangt auf diese Weise aus dem Körperkreislauf über die obere und untere Hohlvene in den rechten Vorhof und wird über den rechten Ventrikel in den Lungenkreislauf gepumpt, wo die Reoxigenierung des Blutes erfolgt. Der linke Vorhof empfängt über die vier Lungenvenen das mit Sauerstoff angereicherte, arterielle Blut aus der Lunge und

leitet es in die linke Herzkammer weiter. Diese pumpt das Blut über die Aorta in den großen Körperkreislauf.

1.2 Aufbau und Struktur der Herzklappen

Früher war es eine allgemein akzeptierte Meinung, Herzklappen seien einfache Gebilde, die lediglich durch passive Bewegungen, zum unidirektionalen Blutfluss im Herzen beitrugen (Cooper et al. 1966). Dieses Verständnis als „passive Strukturen“ führte zur Entwicklung der „passiven“ mechanischen und biologischen Klappen. Es zeigte sich jedoch im Laufe der Zeit, dass Herzklappen viel komplexere Konstrukte darstellen, bestehend aus unterschiedlichen zellulären und extrazellulären Komponenten, spezialisiert auf die Einflüsse der Mikroumgebung in der sie platziert sind (Yacoub et al. 1999).

1.2.1 Zelluläre Komponenten der Herzklappen

Grundsätzlich unterscheidet man bei den zellulären Anteilen einer Herzklappe zwei verschiedenen Zelltypen, die interstitiellen Klappenzenellen und die endokardialen Klappenzenellen.

1.2.1.1 Interstitielle Klappenzenellen

Die interstitiellen Klappenzenellen sind die essentielle Komponente des intrinsischen Reparatursystems. Die ständige Bewegung der Klappenzenel bzw. Klappentaschen verursacht Schäden, auf welche die interstitiellen Klappenzenellen antworten, um die Funktionalität und Intigrität der Klappen zu wahren (Schneider und Deck 1981). Ein Fehlen dieser Zellen ist eine mögliche Ursache für das strukturelle Versagen bisher verwendeter Herzklappenprothesen. Es sind meist schlanke längliche Zellen mit langen, die Klappenmatrix durchdringenden, Fortsätzen (Filip et al. 1986). Sie sind untereinander verbunden, wodurch sie ein dreidimensionales Netzwerk bilden, welches mit den extrazellulären Klappenmatrixkomponenten assoziiert ist. Es wird angenommen, dass die interstitiellen Klappenzenellen aus verschiedenen

morphologisch und strukturell unterschiedlichen Populationen bestehen. So wurde zum einen ein kontraktiler Zelltyp gefunden, welcher durch die Expression spezifischer Zytoskelettproteine einer glatten Muskelzelle ähnelt. Zum anderen wird ein Zelltyp mit sekretorischen Eigenschaften, reich an rauem endoplasmatischem Retikulum und ausgedehntem Golgi-Apparat, beschrieben (Filip et al. 1986, Zacks et al. 1991). Eine Übersicht über einige der bisher erforschten Eigenschaften und Charakteristika vermittelt Tabelle 1.

Tab. 1 : Übersicht über einige Hauptmerkmale der interstitiellen Herzklappenzellen

Anatomisches oder physiologisches Merkmal	nachgewiesen durch	Referenz
Zytoskelett	α -smooth muscle actin (α -SMA) Färbung	(Filip et al. 1986, Taylor et al. 2000)
	Vimentin Färbung	(Messier et al. 1994)
	Desmin Färbung	(Messier et al. 1994, Taylor et al. 2000)
	Myosin Färbung	(Taylor et al. 2000)
	α -myosin heavy chain (α -MHC) Färbung	(Roy et al. 2000)
	β -myosin heavy chain (β -MHC) Färbung	(Roy et al. 2000)
	Troponin T, I, C Färbung	(Roy et al. 2000) (Messier et al. 1994)
	α -Tubulin Färbung	(Taylor et al. 2000)
	β -Tubulin Färbung	
Kontraktilität	Reaktion auf Epinephrin, Angiotensin II	(Filip et al. 1986, Messier et al. 1994)
	Reaktion auf Bradikinin, Carbachol, Kaliumchlorid, Endothelin I	(Messier et al. 1994)
Matrixsekretion	Prolyl-4-Hydroxylase/ Kollagen I Färbung	(Taylor et al. 2000, Messier et al. 1994)
	Fibronektin Färbung Chondroitinsulfat (GAG) Färbung	(Messier et al. 1994)
Fibroblastenartige morphologische Merkmale	Gut entwickeltes rER und Golgi-Apparat, reich an Mikrofilamenten, enge Verknüpfung mit extrazellulärer Matrix	(Filip et al. 1986)

1.2.1.2 Endokardiale Klappenzen (Herzklappenendothel)

Die endokardialen Klappenzen bilden die abschließende zum Lumen gerichtete Schicht der Herzklappen. Die genaue Rolle dieser Zellen ist noch größtenteils unklar, jedoch wird angenommen, daß sie ähnliche Aufgaben erfüllen wie die Gefäßendothelzellen, über deren vielfältige Funktionen es bereits signifikante Daten gibt (Bachetti und Morbidelli 2000). So ist bekannt, dass die Endothelzellen der Herzklappen eine anti-thrombogene Oberfläche bilden. Bei den meisten heute verwendeten Herzklappenprothesen fehlt eine solche funktionstüchtige Endothelzellschicht, was eine Ursache für Thrombozyten und Fibrinablagerungen, bakterielle Infektionen und Gewebsverkalkung in z.B. glutaraldehyde-fixierten biologischen Herzklappen darstellen könnte (Lehner et al. 1997, Frater et al. 1992). Eine weitere Funktion liegt in der Regulation angrenzender interstitieller Klappenzen. So existiert eine komplexe Interaktion zwischen Endothel und benachbarten interstitiellen Zellen, welche zum Teil durch Sekretion löslicher Mediatoren vermittelt wird (Guarda et al. 1993). Ähnlich wie beim Gefäßendothel existieren morphologisch unterschiedliche Zellformen, so werden längliche und polygonale Zellen beobachtet (Hurle et al. 1985). Tabelle 2 vermittelt einen Überblick über die bisher erforschten anatomischen und physiologischen Merkmale der endokardialen Klappenzen.

Tab. 2 : Übersicht über einige Hauptmerkmale der Herzklappenendothelzellen

Anatomisches oder physiologisches Merkmal	nachgewiesen durch	Referenz
Morphologie	Kopfsteinpflasterstruktur	(Manduteanu et al. 1988)
	Regionale Unterschiede in der Zellmorphologie (längliche Zellformen, Kopfsteinpflasterstruktur)	(Hurle et al. 1985)
	Ausbildung von Mikro-Appendices an der Zelloberfläche	(Hill und Folan-Curran 1993)
Zytoskelett	Vimentin Färbung	(Schurch et al. 1984)
Metabolische Funktion	Von Willebrand Faktor Produktion	(Wagner und Marder 1984)
	Prostazyklin Biosynthese	(Manduteanu et al. 1988)
	Produktion der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS)	(Smith et al. 1993)
Ultrastrukturelle Merkmale	Gut entwickeltes rER und Golgi-Apparat	(Manduteanu et al. 1988)

1.2.2 Extrazelluläre Komponenten der Herzklappen

Die extrazellulären Komponenten der Herzklappen, auch als extrazelluläre Matrix bezeichnet, bilden ein komplexes dreidimensionales Gerüst, welches mechanische Stabilität gewährt und in welchem Zellproliferation und Differenzierung der Klappenzellen stattfindet. Dabei handelt es sich um ein Geflecht aus verschiedenen Polysacchariden, fibrillären Makromolekülen und Adhäsionsproteinen, welche von den Klappenzellen sezerniert werden. Hauptsächlich ist die extrazelluläre Matrix aus den faserbildenden Makromolekülen Kollagen und Elastin und den Proteoglykanen aufgebaut. So beträgt bei einer Aorten- bzw. Pulmonalklappentasche der Anteil an Kollagen ca. 60% (Vesely und Noseworthy 1992), Elastin ca. 13% (Scott und Vesely 1996) und Proteoglykane ca. 20% (Rothenburger et al. 2002) des Trockengewichts.

Beim Kollagen, welches am meisten zur mechanischen Stabilität der Klappe beiträgt, handelt es sich hauptsächlich um Typ I (ca. 74%) und Typ Typ III (ca. 24%) (Cole et al. 1984). Die Glycosaminoglykanseitenketten der Proteoglykanmoleküle formen durch ihre hohe wasserbindende Kapazität eine gelartige Grundsubstanz und bestehen hauptsächlich aus Hyaluronsäure, Dermatansulfat, Chondroitinsulfat und einem geringen Anteil Heparansulfat (Murata 1981). Die drei Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix sind nicht gleichmäßig verteilt, sondern liegen in variierenden Konzentrationen vor, wodurch sich verschiedene Schichten der Segel bzw. Taschen, mit jeweils unterschiedlicher morphologischer Struktur und Funktionalität unterscheiden lassen. In ihrem Aufbau unterscheiden sich vor allem die Semilunar- von den AV-Klappen. Entsprechend dem Thema dieser Arbeit, soll im weiteren Verlauf der schichtweise Aufbau am Beispiel der Aortenklappe besprochen werden.

1.2.2.1 Schichtweiser Aufbau der Aortenklappe

Die Taschen der Aorta bestehen aus mehreren Bindegewebsschichten. Diese Schichten lassen sich durch unterschiedliche Dichte, Zusammensetzung und Funktionalität charakterisieren. Sie werden als Arterialis, Fibrosa, Spongiosa und Ventrikularis bezeichnet (s. Abb. 1). Die Arterialis stellt die äußere, dem Ventrikel abgewandte Seite der Klappe dar und besteht aus einer dünnen Schicht mit schmalen, locker angeordneten Kollagen- und Elastinfasern. Die darunter liegende Fibrosa stellt den stärksten und steifsten Teil der Klappentasche dar. Sie besteht aus dichtgepackten Kollagenbündeln. Diese sind in transversaler Richtung parallel zu den freien Taschenenden wellenförmig angeordnet und geben dadurch der Blutausstromseite der Klappe ihr charakteristisches Aussehen. Die Fibrosa verleiht der Tasche Festigkeit gegenüber Spannungs Kräften, die während der Diastole auftreten. Durch die wellenförmige Anordnung ihrer Fasern wird ein Ausdehnen während des Klappenschlusses ermöglicht (s. Abb. 1). Die nächstfolgende Schicht ist die Spongiosa. Sie besteht aus einer semifluiden Masse, mit variierender Zellzahl, und Ausdehnung. Bis auf ein paar wenige, spärlich angeordnete, radialverlaufende Kollagenfasern, lassen sich kaum fibrilläre Matrixkomponenten identifizieren (Schoen und Levy 1999). Der gelartige Charakter dieser Schicht wird durch die wasserbindenden Eigenschaften der Glucosaminoglykane, Seitenketten der

Proteoglykane, die den dominanten Matrixbestandteil bilden, hervorgerufen. Die Spongiosa verleiht der Klappentasche Festigkeit und Flexibilität (Culav et al. 1999). Sie absorbiert Scherkräfte zwischen Ventrikularis und Fibrosa, die während des Klappenzyklus auftreten (Schoen 1997). Durch das Abfedern von Vibrationen dient sie als eine Art Stoßdämpfer während des diastolischen Klappenschlusses (Murata 1981, Kunzelman et al. 1993). Die äußere, dem Ventrikel zugewandte Schicht der Tasche, wird als Ventrikularis bezeichnet. Sie ist im Gegensatz zur Fibrosa bzw. Spongiosa relativ dünn und besteht aus einem Netzwerk aus elastischen Fasern, sowie wenigen Kollagenfaserbündeln (Scott und Vesely 1996), das der Klappentasche ihre hohe Flexibilität gewährt und somit das Ausdehnen während der Diastole und das Zusammenziehen während der Systole (Scott und Vesely 1995, Vesely 1998) ermöglicht (s. Abb. 1).

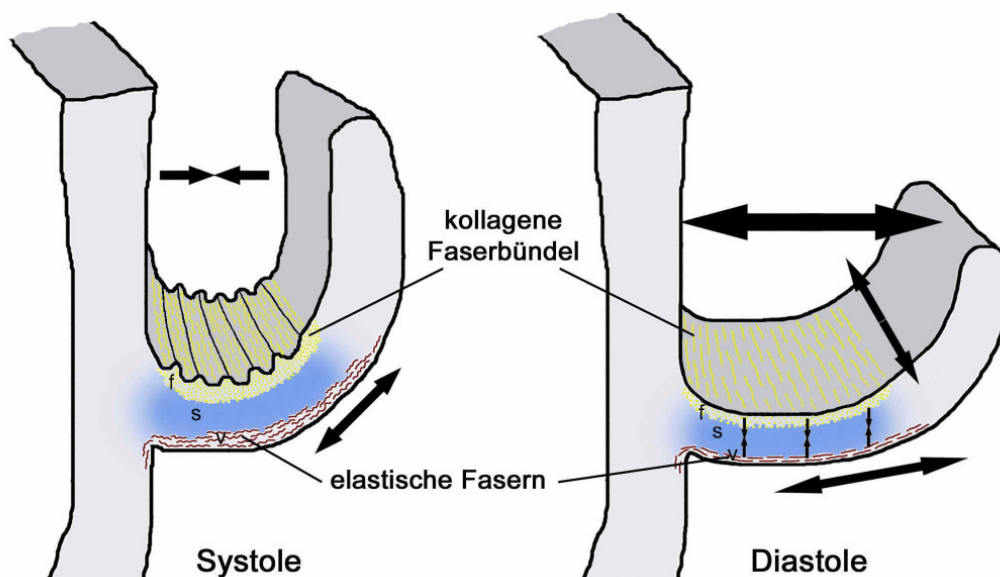


Abb. 1: Verformung der Klappentaschen während der Systole und Diastole mit entsprechender schematischer Darstellung der kollagenen und elastischen Fasern. (f= fibrosa; s= spongiosa; v= ventrikularis) (modifiziert nach Schoen 1997)

Stimmt das Zusammenspiel der verschiedenen Strukturkomponenten nicht, bzw. wird durch Einflüsse gestört, kommt es zu insuffizienten Herzklappen mit eingeschränkter Funktion, was zu einer Verminderung der Herzleistung führt.

1.3 Erkrankungen der Herzklappen

Im Jahr 2002 waren Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems mit 46,8% aller registrierten Todesfälle die häufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2004). Pathologische Veränderung der Herzklappen stellen dabei, nicht nur in Deutschland, eine bedeutende Untergruppe dar.

Jährlich werden weltweit schätzungsweise 275.000 Eingriffe an Herzklappen durchgeführt (Rabkin und Schoen 2002). 16.800 Eingriffe davon allein in Deutschland (Kalmar und Irrgang 2004).

Es werden zwei prinzipielle Krankheitstypen für die Klappen unterschieden, die ein ordnungsgemäßes Öffnen und Schließen verhindern. Der erste Typ ist die Klappenstenose, bei der sich die Herzklappe auf Grund der krankhaften Veränderungen nicht mehr ausreichend öffnen kann. Durch die verengte Klappe kommt es zu einer Behinderung des Blutflusses. Der zweite Typ ist die Klappeninsuffizienz. Die Herzklappe kann sich nicht mehr zuverlässig schließen und es kommt zu einem Rückstrom von Blut. Bestehen Klappenstenose und –insuffizienz gleichzeitig an einer Herzklappe, spricht man von einem kombinierten Herzklappenfehler. Erkrankungen der Herzklappen haben verschiedene Ursachen. Sie können angeboren sein oder durch altersbedingte Degenerationen, direkten Befall mit Infektionskrankheiten (Viren, Bakterien) oder als Folge von rheumatischen Erkrankungen entstehen. Tabelle 3 vermittelt einen Überblick über häufige Herzklappenfehler und deren mögliche Ursachen.

Tab. 3: Übersicht über Herzklappenfehler und Ursachen (modifiziert nach Kaltenbach 2000)

	Rheumatische Endokarditis	Bakterielle Endokarditis	Angeboren	Fehlbildung	Sonstige Ursachen
Mitralstenose	+	+ (spätfolge)			Vorhofmyxom
Mitral- insuffizienz	+	+	+	Mitralprolaps	Myokardinfarkt
Aortenstenose	+		+		
Aorten- insuffizienz	+	+	+	Marfan- syndrom	Aortenaneurysma, Morbus Bechterew
Pulmonalstenose			+		
Pulmonal- insuffizienz					Iatrogen nach Klappensprengung
Trikuspidalstenose	+				
Trikuspidal- insuffizienz			+	Ebstein- syndrom	Endokarditis bei Drogensüchtigen

1.4 Möglichkeiten des Herzklappenersatzes

Die ersten Errungenschaften im Bereich des Herzklappenersatzes stammen aus den 50er Jahren, mit der ersten erfolgreichen Implantation einer Herzklappe in den Menschen, durchgeführt im Jahr 1952 (Hufnagel et al. 1954). In den darauf folgenden Jahrzehnten wurden über 80 verschiedene Herzklappenprothesen entwickelt (Vongpatanasin et al. 1996); wobei diese in mechanische Klappen, die vollständig aus synthetischen Komponenten bestehen und biologische Klappen, welche aus biologischen Gewebe gefertigt sind, eingeteilt werden. 55% aller weltweit implantierten Klappen sind mechanische Klappen, die restlichen 45% biologisch (Butany et al. 2003a). Zwar ist sowohl mit biologischen als auch mit mechanischen Klappenprothesen eine Wiederherstellung einer ausreichenden Ventilfunktion innerhalb der Strombahn des Herzens möglich, womit die Lebenserwartung und Lebensqualität der Patienten gesteigert werden kann, jedoch bestehen verschiedene Limitationen und Nachteile. Der größte Vorteil der mechanischen Klappen ist ihre Stabilität und ihre nahezu unbegrenzte Haltbarkeit, jedoch wirken alle mechanischen Klappen thrombogen, was eine lebenslange Behandlung mit Antikoagulantien erforderlich macht. Außerdem können im Rahmen von Thromboembolien und infektiösen Prozessen Fehlfunktionen in der Klappenmechanik auftreten. Auch das

bei mechanischen Klappen auftretende Klappengeräusch, in der Regel als Klappenклик bezeichnet, stellt für viele Patienten ein psychologisches Problem dar. Bioprothesen werden aus chemisch vorbehandelten tierischen (xenogenen) oder menschlichen (allogenen) Gewebe gewonnen. Xenogene Klappen bestehen typischer Weise aus Aortengewebe vom Schwein oder aus Rinderperikard, welche mit Glutaraldehyd konserviert und auf einem unterstützenden Rahmen montiert werden. Das Glutaraldehyd vermindert die antigene Potenz des Gewebes, und erhöht die Stabilität der Klappe durch intermolekulare Quervernetzung der kollagenen Fibrillen. Die fertigen Klappen bestehen aus avitalem, nicht mehr regenerationsfähigem Gewebe, so dass Degeneration und Verkalkung mit zunehmender Implantationsdauer zur Zerstörung des kollagenen Grundgerüsts führen. Die Lebensdauer von xenogenen Klappen wird daher mit nicht länger als 10-15 Jahre angegeben, sie ist abhängig von Position der Implantation und Alter des Patienten. So kommen bei jüngeren Patienten biologische Klappen nur sehr selten zum Einsatz, da Kalzifizierungsprozesse viel stärker auftreten als bei älteren Menschen (Curcio et al. 1981, al-Khaja et al. 1991). Vorteile der xenogenen Klappen sind die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit von Spendergewebe und ihre besseren hämodynamischen Eigenschaften, sowie die geringere Thrombogenität gegenüber mechanischen Klappen, so dass die Patienten im Allgemeinen nicht auf lebenslange medikamentöse Antikoagulation angewiesen sind (Butany et al. 2003b).

Eine weitere Gruppe der biologischen Klappen stellen die kryokonservierten menschliche Herzklappen dar. Diese stammen entweder von Empfängerherzen bei Herztransplantationen, oder von Organspendern, bei denen das Herz aus bestimmten Gründen nicht für eine Transplantation verwendet werden konnte. Die natürliche Form der Klappensegel bzw. Klappentaschen dieser auch synonym als Homografts bezeichneten Klappen bietet eine verbesserte funktionelle Performance mit nahezu idealen hämodynamischen Flusseigenschaften. Das Risiko für thromboembolische Ereignisse ist dadurch verringert. Homografts werden durch die Kryokonservierung, eine fraktionierte Kühlung der steril entnommenen Klappen mit flüssigem Stickstoff auf Temperaturen zwischen -40°C bis -196°C , hergestellt. Alternativ zur Kryokonservierung können die Klappen auch nach unsteriler Entnahme durch Antibiotika dekontaminiert werden und in Antibiotikanährlösungsgemischen bei 4°C verwahrt werden. Ein Nachteil der Homografts ist ihre mögliche Antigenität, so dass immer ein Risiko für eine Beschädigung der Klappen durch immunologische

Reaktionen besteht und ihre Haltbarkeit dadurch eingeschränkt ist. Ein weiterer Nachteil ist die geringe Verfügbarkeit von Spendergewebe.

Die mittlerweile über dreißigjährige Forschung auf dem Gebiet des Herzklappenersatzes, hat eine Vielzahl verschiedenster Klappenprothesen hervorgebracht, die alle eine weitgehende Wiederherstellung der Klappenfunktion ermöglichen. Allerdings können sie die native Herzklappe bei weitem nicht risikolos imitieren und besitzen verschiedene Limitationen die ihren Einsatz einschränken. So verfügt keines der zur Zeit verwendeten Klappenmodelle über eine ausreichende, langfristige Biokompatibilität oder ein entsprechendes Potential zum Wachstum, zur Autoreparatur oder zum „Remodelling“. Gerade bei pädiatrischen Patienten stellt die fehlende Wachstumsmöglichkeit der Klappen ein großes Problem dar, da diese oft mehrere Operationen bis zum finalen Klappenersatz benötigen. Nach Roberts zeichnet sich die „ideale Herzklappe“ durch folgende Kriterien aus:

Die ideale Herzklappenprothese

- besitzt gute hämodynamische Charakteristika, d.h. sie darf nicht obstruierend wirken, das physiologische Flussmuster soll erhalten bleiben, sie muss wirkungsvoll schließen;
- ist nicht thrombogen, eine Antikoagulation ist nicht notwendig;
- ist unbegrenzt haltbar, d.h. es findet keine Degeneration und kein Verschleiß statt;
- verursacht keine signifikante Veränderung an Bestandteilen des Blutes, d.h. keine Zunahme der Hämolyseparameter;
- ist problemlos implantierbar;
- darf den Patienten nicht beeinträchtigen.

(Roberts 1976)

Bis heute haben diese Forderungen ihre Gültigkeit erhalten, sind aber nur zum Teil erfüllt. In den letzten Jahren wurde das Spektrum der Forschung zur Herstellung einer solchen idealen Herzkappe durch das multidisziplinäre Forschungsgebiet des Tissue Engineerings (Gewebezucht) erweitert.

1.5 Tissue Engineering von Herzklappen

Tissue Engineering ist ein noch recht junger Forschungsbereich, der Grundlagenwissenschaften und Materialwissenschaften mit klinischen Disziplinen verbindet mit dem Ziel, die Funktion von erkrankten, fehlenden oder missgebildeten Organen bzw. Organbestandteilen durch die Verwendung von lebendem Material, das dem Patienten eingesetzt wird, wiederherzustellen. Biologen und Ärzte haben auf dem Gebiet des Tissue Engineerings schon heute große Erfolge erzielt. Zwar ist es bis zur kompletten autologen Rekonstruktion komplexer Organe sicher noch ein weiter Weg, doch die Züchtung von einzelnen Geweben gelingt bereits. So werden *in vitro* gezüchtete Haut und Knorpelgewebe bereits erfolgreich in der Klinik eingesetzt. Das Verfahren des Tissue Engineerings von Herzklappen beschäftigt sich mit der Herstellung lebendiger und funktionstüchtiger Herzklappen. Das Grundprinzip ist, Zellen auf ein biokompatibles und biodegradables Grundgerüst aufzubringen, welches die Form einer Herzklappe besitzt und mechanische Stabilität gewährt. Haben sich die Zellen angesiedelt, kann das resultierende dreidimensionale Konstrukt implantiert werden. Während die Zellen beginnen einen neuen zellulären und extrazellulären Gewebeverband zu produzieren, wird das Grundgerüst parallel dazu schrittweise abgebaut, so dass am Ende nur das neu gebildete Gewebe übrig bleibt. Ein Konzept zur Herstellung eines lebenden künstlichen Herzklappenersatzes wurde erstmals von Shinoka präsentiert. Dabei wurden unter Verwendung einer bioresorbierbaren Polymerschablone, die mit allogenen und autologen Zellen besiedelt worden war, einzelne Klappentaschen konstruiert (Shinoka et al. 1995). Für eine künstlich hergestellte, lebende Herzklappe sind drei Komponenten erforderlich. Man benötigt Zellen, die das neue Gewebe bilden sollen, Grundgerüste, welche den aufgebrauchten Zellen als Stützgerüst dienen und ihnen eine dreidimensionale Vorlage entsprechend der Form des zu erschaffenen Organs bzw. Gewebes bieten, sowie Signale und Kulturbedingungen, welche die Gen-, Proteinexpression, Zellproliferation und die Produktion der extrazellulären Matrixbestandteile während der Gewebsentwicklung beeinflussen.

1.5.1 Mögliche Zellpopulation für das Tissue Engineering von Herzklappen

Um eine funktionstüchtige, lebende Herzklappe herzustellen, werden vitale Zellen benötigt, die in der Lage sind, neue zelluläre und extrazelluläre Matrixbestandteile zu bilden. Auch ist es erforderlich, dass diese Zellen vom Organismus später toleriert werden. Deshalb wird für das Tissue Engineering von kardiovaskulären Strukturen der Einsatz von körpereigenen, autologen Zellen angestrebt. Zur Gewinnung solcher Zellpopulationen wurden verschiedene Quellen erschlossen (s. Tab. 4).

Tab. 4: Übersicht über mögliche Zellquellen für das Tissue Engineering von Herzklappen

Zellquellen		Referenz
Arterien	<i>A. femoralis</i>	(Shinoka et al. 1995)
	<i>A. carotis</i>	(Hoerstrup et al. 2000b, Stock et al. 2000, Sodian et al. 2000)
	<i>Aorta ascendense</i>	(Schnell et al. 2001)
Venen	<i>Vena saphena magna</i>	(Schnell et al. 2001)
Herzklappensegel	<i>Trikuspidalklappe</i>	(Maish et al. 2003)
Epidermis		(Shinoka et al. 1997, Zeltinger et al. 2001)
Nabelschnur		(Kadner et al. 2002)
Blut	<i>Endotheliale-Progenitorzellen</i>	(Rafii 2000)
	<i>Glattmuskuläre-Progenitorzellen</i>	(Simper et al. 2002)
Knochenmark		(Hoerstrup et al. 2002, Perry et al. 2003)

1.5.2 Grundgerüste für das Tissue Engineering von Herzklappen

Geeignete Trägersubstrate für das Tissue Engineering müssen bestimmte Anforderungen erfüllen. Für die Entstehung eines funktionstüchtigen Gewebes ist eine optimale Interaktion zwischen Zellen und der sie umgebenden Matrix erforderlich. Die Startermatrix sollte so konstruiert sein, dass sie eine gute und dauerhafte Zellbesiedlung ermöglicht und mechanische Stabilität gewährt, bis neu gebildetes Gewebe diese Funktion übernehmen kann (Putnam und Mooney 1996).

Weiterhin sollte sie *in vivo* im Laufe der Zeit degenerieren bzw. durch natürliche Prozesse innerhalb des Organismus abgebaut werden können, wobei ein möglichst optimales Verhältnis hinsichtlich Abbau des Trägersubstrates und Neubildung von Gewebe angestrebt wird. Zur Zeit werden im Tissue Engineering von kardiovaskulären Strukturen eine Reihe verschiedener Substanzen zur Herstellung solcher Startschablonen getestet. Dabei unterscheidet man zwischen Gerüsten die aus synthetischen oder biologischen Materialien geformt werden. Ein Problem dabei ist die eingeschränkte Möglichkeit zur exakten Nachbildung der komplexen anatomischen Strukturen einer Herzklappe. Mit Hilfe neuer Techniken zur Erstellung dreidimensionaler Konstrukte, z.B. durch die Nutzung von stereolithographischen Methoden, ließen sich jedoch in diesem Bereich bereits Fortschritte erzielen (Sodian et al. 2002). In Tabelle 5 sind einige Materialien, die bisher zur Konstruktion von Startmatrices eingesetzt wurden, aufgeführt.

Tab. 5: Übersicht über einige Materialien, die zur Herstellung von Startmatrices im Bereich des Tissue Engineerings eingesetzt wurden

Matrix hergestellt aus	Bemerkungen	Referenz
Biomaterialien		
<i>dezellularisiertes Perikard</i>	wird gut resorbiert, gute Proliferation der Zellen, Bildung von Mikrogefäßen	(Courtman et al. 1994)
<i>Dünndarmsubmukosa</i>		(Badylak et al. 1998, Voytik-Harbin et al. 1997)
<i>Fibringel</i>	Material kann aus Patientenblut gewonnen werden, Degenerationsrate lässt sich durch Zugabe von Aprotinin verändern, für direkte Implantation ist die mechanische Stabilität nicht ausreichend	(Jockenhoevel et al. 2001)
Polymerverbindungen		
Polyglykolsäure	Abbau durch Hydrolyse (6-8 Wochen), verursacht lokale Entzündungsprozesse, hohe Steifigkeit	(Shinoka et al. 1995, Hutmacher et al. 1996)
Polymilchsäure	lange Degenerationsphase durch geringere Hydrolyserate (52 Wochen)	(Hollinger 1983)
Polyglykolsäure+ Polyhydroxyoctanoat	lange Degenerationsphase (>52 Wochen)	(Stock et al. 2000)
Poly-4-Hydroxy-butyrat	Degenerationsphase 10-52 Wochen	(Hein et al. 1997)

Eine Alternative zur künstlichen Konstruktion von Grundgerüsten aus biologischen oder synthetischen Materialien besteht in der Verwendung von natürlich vorgegebenen Formen. Durch die Nutzung von dezellularisierten Herzklappen als Startermatrix sind die komplexen anatomischen Strukturen bereits vorhanden und müssen nicht durch aufwendige Methoden nachgebaut werden. Durch die Entfernung der Zellen aus den allogenen oder xenogenen Herzklappen wird die Immunantwort im späteren Empfängerorganismus verringert. Dabei kommt es zum einen auf eine möglichst vollständige Entfernung der zellulären Elemente an, da übrige Zellen und Zelltrümmer zu Entzündungsreaktionen und Verkalkungsprozessen innerhalb des Implantates führen können, wodurch die Langzeitfunktion der Klappe beeinträchtigt wird (Schoen 1999). Auf der anderen Seite ist zu beachten, dass die extrazelluläre Matrix in ihrer Zusammensetzung und Struktur nicht durch das Dezellularisierungsverfahren geschädigt wird, was zu einer Einschränkung der biomechanischen Funktion führen würde. Für die Extraktion der Zellen sind verschiedene Methoden entwickelt und erprobt wurden. Dabei kommen ionische und nichtionische Detergenzien, hypo- oder hypertone Lösungen und enzymatische Verfahren zum Einsatz (s. Tab. 6).

Tab. 6 : Übersicht über eingesetzte Verfahren zur Dezellularisation von Herzklappen

Dezellularisierungsverfahren	Referenz
Triton X-100	(Bader et al. 1998, Grauss et al. 2003, Kasimir et al. 2003)
Triton X-100 + Natriumdesoxycholat	(Kasimir et al. 2003, Rieder et al. 2004, Spina et al. 2003)
SDS	(Booth et al. 2002, Grauss et al. 2003, Kasimir et al. 2003, Rieder et al. 2004)
Natriumdesoxycholat	(Booth et al. 2002)
PEG	(Booth et al. 2002)
N-Cetylpyridiniumchlorid	(Spina et al. 2003)
Destilliertes Wasser	(Booth et al. 2002)
Trypsin	(Grauss et al. 2003, Kasimir et al. 2003)
Trypsin-Triton X-100	(Grauss et al. 2003)
Trypsin-EDTA	(Steinhoff et al. 2000, Cebotari et al. 2002, Leyh et al. 2003, Schenke-Layland et al. 2003a, Rieder et al. 2004)

1.5.3 Signale und Kulturbedingungen

Um ein funktionstüchtiges Organ oder Gewebe herstellen zu können, kommt es nicht nur auf geeignete Zellen und Trägersubstrate an, sondern auch auf die richtige Kulturbedingung, in der die *in vitro* Prozesse der Gewebeherstellung ablaufen. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Hormonen hat Auswirkungen auf die Differenzierung und Proliferation der Zellen. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von mechanischen Stimuli und physikalischen Signalen das Wachstum von Zellen und Gewebe verbessert wird (Weston et al. 1999, Minuth et al. 2000, Nerem und Seliktar 2001). Dies führte zur Entwicklung von Bioreaktorsystemen, in denen die Konstrukte aus Matrix und aufgetragenen Zellen pulsatilem Fluss- und Druckkräften ausgesetzt werden (Hoerstrup et al. 2000a, Dumont et al. 2002, Niklason et al. 2002, Ratcliffe und Niklason 2002, Barron et al. 2003, Schenke-Layland et al. 2003b). Dadurch wird eine funktionsspezifische Umgebung geschaffen, in der die hergestellten Gewebe präkonditioniert und an die späteren *in vivo* Bedingungen gewöhnt werden können.

1.6 Konzept zur Herstellung eines autologen Aortenklappenersatzes

Bisherige Konzepte zur Herstellung eines idealen Herzklappenersatzes mittels Tissue Engineerings beschränkten sich ausschließlich auf den Einsatz in der Pulmonalkappenposition (Dohmen et al. 2003, Shinoka et al. 1995, Rabkin und Schoen 2002, Leyh et al. 2003, Hoerstrup et al. 2000b, Sodian et al. 2000, Steinhoff et al. 2000, Stock et al. 2000), in der die Klappen geringeren Drücken ausgesetzt sind. Da die meisten chirurgischen Eingriffe an Herzklappen im Bereich der Aortenklappe durchgeführt werden (s. Tab. 7), kommt der Entwicklung von Herzklappen die den hohen Druckverhältnissen in der Systemzirkulation standhalten, eine weitaus größere klinische Bedeutung zu.

Tab 7: Übersicht über die Verteilung der Eingriffe an den einzelnen Herzklappen in Deutschland im Jahr 2003 (Kalmar und Irrgang 2004)

Position	Anzahl der Eingriffe
Aortenklappe	10353
Mitralklappe	3969
Trikuspidalklappe	247
Pulmonalklappe	44
Insgesamt	14613

In unserer Arbeitsgruppe wurde daher ein Konzept zur *in vitro* Herstellung eines autologen, vitalen Aortenklappenersatzes entwickelt (s. Abb. 2). Dabei wurden dezellularisierte Schweineherzklappen mit aus Schafarteriensegmenten isolierten Myofibroblasten und Endothelzellen rebesiedelt und unter dynamischen Bedingungen in einem Bioreaktor kultiviert. Durch die Exposition mit physikalischen Signalen gelang es, vitale und biomechanisch stabile Klappen herzustellen, welche morphologische und mechanische Charakteristika von Aortenklappen besaßen (Schenke-Layland et al. 2003b).

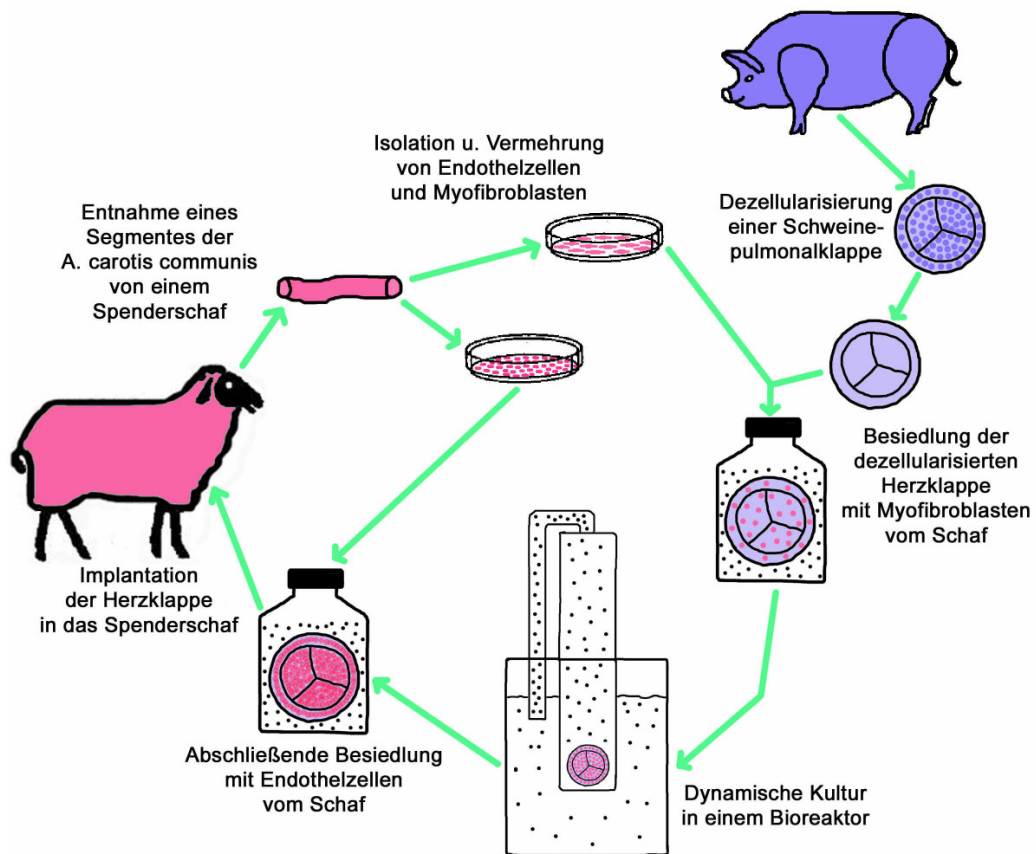


Abb. 2. Konzept zur *in vitro* Herstellung eines autologen Aortenklappenersatzes

Aufbauend auf diesem Verfahren zur *in vitro* Herstellung eines Aortenklappenersatzes befasst sich diese Arbeit mit dem erstmaligen Einsatz solcher Klappen im Hochdrucksystem des lebenden Organismus.

2. Ziele der Arbeit und Fragestellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Herstellung von Herzklappen auf der Grundlage des unter 1.6 dargestellten Konzeptes durch Rebesiedlung dezellularisierter Schweinepulmonalklappen mit autologen Myofibroblasten und Endothelzellen vom Schaf. Die auf diese Weise gefertigten Klappen wurden in die Systemzirkulation des Schafes für eine Dauer von 1, 2 und 3 Monaten implantiert und anschließend durch makroskopische Beurteilung, Rasterelektronenmikroskopie, Histologie und Immunhistochemie in Bezug auf ihre zellulären und extrazellulären Strukturen charakterisiert. Zusätzlich kamen zur Kontrolle Herzklappen, die nur mit Myofibroblasten bzw. nur mit Endothelzellen besiedelt waren zum Einsatz. Als Vergleichsgewebe dienten dezellularisierte und native Herzklappen. Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

- Besitzen die Klappen eine ausreichende biomechanische Stabilität, um unter den natürlichen Druck- und Flussbedingungen in der Systemzirkulation bestehen zu können?
- Welche morphologischen Veränderungen erfahren die Herzklappen im Laufe der Implantation hinsichtlich ihrer zellulären und extrazellulären Strukturkomponenten? Wird die Funktion der Klappe dadurch beeinträchtigt?
- Gibt es morphologische Unterschiede zwischen den Herzklappen zu den verschiedenen Explantationszeitpunkten?
- Wie wirkt sich das Fehlen einer Endothelzellschicht auf die Klappe aus? Kommt es zu einer Reendothelialisierung der Klappe ohne Folgen für Struktur und Funktion?
- Kommt es zu einer Rebesiedlung mit matrixproduzierenden Zellen bei Klappen, die nur mit Endothelzellen besiedelt wurden?
- Wie geeignet ist das gewählte Tiermodell für die *in vivo* Untersuchung von tissue-engineerten Herzklappen unter Hochdruckbedingungen?

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an ca. 3 Monate alten Schafen durchgeführt, wobei das Geschlecht unberücksichtigt blieb. Schafe sind günstig in der Anschaffung, unproblematisch in der Tierhaltung, gut zu narkotisieren und international als Tiermodell für biologische Herzklappen etabliert. Sie besitzen ein hohes Kalzifizierungspotential, weshalb biologische Herzklappen, die keine Verkalkung im Schafmodell aufweisen, besonders gut für humane Anwendungen geeignet sind. Die operativen Eingriffe fanden im Tierexperimentellen Zentrum, am Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena statt. Die Unterbringung der Tiere erfolgte in den lokalen Tierstallungen. Sie wurden in einer Gruppe auf Einstreu und Stroh gehalten. Die Ernährung erfolgte mit Kraftfutter, Stroh und Wasser. Vor den Operationen ließ man die Tiere 24h fasten, bei freiem Zugang zu Wasser. Die Grundpflege der Tiere wurde von examinierten Tierpflegern, die veterinärmedizinische Betreuung durch einen Tierarzt und den Leiter des Instituts für Versuchstierkunde, Dr. Schubert, vorgenommen. Die Zulassung der Versuche erfolgte durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (Erfurt) (Nr.02-02/00).

3.2 Herstellung der Herzklappen

Für die Herstellung der Herzklappen wurden dezellularisierte Ferkelklappen verwendet. Myofibroblasten (MF) und Endothelzellen (EZ) wurden aus einem Segment der A. carotis des jeweiligen Versuchstieres gewonnen. Die dezellularisierten Klappen wurden mit diesen MF und EZ besiedelt.

3.2.1 Übersicht über verwendete Materialien und Chemikalien

PBS: (Phosphate buffered saline)	(Invitrogen Corporation)
Kollagenaselösung:	0,2%-ig 0,02g CollagenaseA (Roche) in 10 ml PBS gelöst
HANK's-Lösung:	ohne Phenol Red (Biochrom)
Einfriermedium:	Cryo- SFM (Promocell)
FCS: (Fetales Kälberserum)	(Biochrom)
bFGF: (basic fibroblast growth factor)	(Promega)
Penicillin-Streptomycin:	(Invitrogen Corporation)
Zell- und Gewebenährmedium:	Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen Corporation), 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 60µl bFGF pro 500ml Medium.
Gelatine:	0,1%-ige Gelatine-PBS-Lösung
Zellkulturflaschen:	(Falcon)
6, 24 Well Platten:	(NUNC)
Cryotubes:	(NUNC)
50ml Falcon:	(NUNC)
Trypsin/EDTA-Lösung (zur Klappendezellularisierung):	Trypsin (0,05%)-EDTA (0,02%) PBS-Lösung (Invitrogen Corporation)
Trypsin/EDTA-Lösung (zum Passagieren der Zellen):	Trypsin-EDTA (1x) in HBSS w/o CA&MG W/EDTA. 4NA (Invitrogen Corporation)
Betaisodonna:	(Mundipharma GmbH, Limburg, Germany)
Antibiotikagemisch:	Zur Dekontamination v. Herzklappen Inhalt einer Spritze: 1,2mg Amikacin, 3mg Flucytosin, 1,2mg Vancomycin, 0,3mg Ciproflocacin, 1,2mg Metronidazol (Apotheke des Klinikums der FSU Jena)

3.2.2 Zellisolation und -kultivierung

Den Versuchstieren wurde ein ca. 3 cm langes Segment der Arteria Carotis communis entnommen (siehe 3.3 operative Verfahren). Daraus wurden Endothelzellen durch Ablösen mittels einer intraluminären Kollagenaselösung gewonnen. Durch die Anwendung der sogenannten Explant-Methode wurden Myofibroblasten isoliert.

3.2.2.1 Isolation der Endothelzellen

Die Isolation der Endothelzellen erfolgte mit Hilfe einer Kollagenaselösung. Das unter sterilen Bedingungen gewonnene Gefäßstück wurde vom umgebenen Bindegewebe befreit und ausgestrichen, um mögliche Blutreste zu entfernen. Die Enden des Gefäßes wurden mit einer Pinzette geweitet und mit Kanülenspitzen versehen. Mit Hilfe einer Spritze wurde das Gefäß 3-mal vorsichtig mit Medium durchspült und die Spritze am Gefäßende belassen. Anschließend wurde eine zweite Spritze mit der Kollagenaselösung gefüllt und an das andere Ende des Gefäßes angebracht und das Gefäß mit Kollagenase gefüllt (s. Abb. 3 A). Die Spritzen mit dem Gefäß wurden anschließend für ca. 20 Minuten im Wärmeschrank inkubiert. Danach wurde eine Spritze entfernt und das Gefäß mit 30 ml Medium durchspült. Hierdurch wurde die Kollagenase inaktiviert. Die Flüssigkeit mit den abgelösten Endothelzellen wurde in einem 50 ml Falcon aufgefangen (s. Abb. 3 B). Der verbliebene Rest dieses Gefäßsegmentes wurde zur Isolation der Myofibroblasten mitverwendet. Anschließend wurde das Falcon für 10 Minuten bei 1200 U/min bei 37°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das übriggebliebene Zellpellet in ca. ein Milliliter neues Medium aufgenommen und auf zwei Wells einer mit Gelatine beschichteten 24 Well Platte, zu je 500µl aufgeteilt. Die 24 Well Platte wurde für drei Tage in den Inkubator (Heraeus) (bei 37°C, 5% CO₂) gestellt und nach Erreichen von etwa 75% Konfluenz passagiert. Im Durchschnitt wurden die Endothelzellen alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:3 passagiert. Eine für die Besiedlung ausreichende Zellmenge von ca. 12 Millionen Zellen (drei T75 Flaschen) wurde nach ca. 2-3 Wochen bzw. 8 Passagen erreicht.



Abb. 3: **A)** Entnommenes Carotissegment wird mit Collagenase gefüllt; **B)** Gefäß wird mit Medium durchspült, die abgelösten EC's werden im Falcon aufgefangen; **C)** EC's in Kultur mit typischer Pflastersteinmorphologie

3.2.2.2 Isolation der Myofibroblasten mit Hilfe der Explant-Methode

Bei dieser Methode wurde das deendothelialisierte Carotissegment verwendet. Nach longitudinaler Eröffnung wurde vorsichtig mit einem Skalpell über die Innenseite gefahren, um verbliebene Endothelzellen zu entfernen. Nun wurde das Segment mit der Innenseite nach unten in eine speziell für Zellkultur geeignete Petrischale (Durchmesser 85 mm) der Firma Nunc gelegt und mit einem Skalpell in ca. 1x1 mm große Stückchen zerschnitten und auf dem Boden der Petrischale verteilt (s. Abb. 4 A). Es folgte die vorsichtige Zugabe von 5 ml Medium und nachfolgende Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach 7-14 Tagen bildeten sich kleine Zellinseln um die Gewebestücke herum (s. Abb. 4 B,C). Durch weitere Passage der Zellen alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:3 war nach durchschnittlich 35-42 Tagen die zur Besiedlung nötige Zellmenge vorhanden.

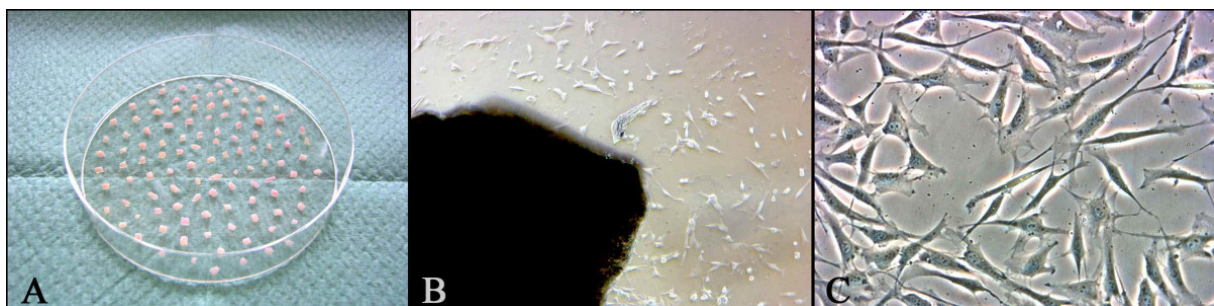


Abb. 4: **A)** Das Carotissegment wird in 1x1 mm große Stückchen zerteilt. **B)** nach 1-2 Wochen kommt es zum Auswachsen von Myofibroblasten **B)** Myofibroblasten in Kultur

3.2.2.3 Passage der Zellen

Zum Passagieren wurden die Zellen mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (Einwirkzeit 60 s) abgelöst und in ein Falcon überführt. Nach anschließender Zentrifugation (37°C, 1200 U/min) wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet in frisches Medium resuspendiert und auf die neuen mit Gelatine vorbeschichteten Zellkulturgefäße aufgebracht.

3.2.2.4 Einfrieren der Zellen

Da die Kulturzeiten der Endothelzellen deutlich unter denen der Myofibroblasten lagen, erfolgte eine zwischenzeitliche Kryokonservierung der Endothelzellen. Hierfür wurden die Zellen von jeweils zwei T75 Flaschen mit Trypsin/EDTA abgelöst, das nach dem Zentrifugieren übriggebliebene Zellpellet in 2 ml Einfriermedium aufgelöst und in ein Cryotube abgefüllt. Das Cryotube wurde mit einer Einfrierhilfe stufenweise mit ca. 1 °C pro Minute abgekühlt und bei –80 °C gelagert.

3.2.2.5 Auftauen der Zellen

Zur Verwendung der eingefrorenen Zellen ließ man die Cryotubes bei Zimmertemperatur auftauen. Der Inhalt wurde in ein 50 ml Falcon übernommen und nach Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet in frisches Medium resuspendiert und auf mit Gelatine vorbeschichtete Zellkulturgefäße aufgebracht.

3.2.3 Dezellularisierung der Herzklappen

Die Herzen von 27-35 kg schweren Schweineferkeln wurden unter sterilen Kautelen explantiert. Die Entnahme erfolgte durch eine rechtsseitige laterale Thorakotomie im Bereich des vierten Intercostalraumes. Nach Eröffnen des Perikardbeutels wurde das gesamte Herz mit Aorta ascendens und Pulmonalarterie entnommen und für mindestens 30 Minuten in Betaisodonnalösung inkubiert. Nach dreimaligem Spülen der Ferkelherzen mit PBS wurde die Pulmonalklappe zusammen mit dem sich

anschließenden Pulmonalarteriensegment (Länge >2,5cm) herauspräpariert und vom umliegenden Fett- und Bindegewebe befreit. Dabei wurde ein schmaler Rand des valvulären Herzmuskelgewebes belassen (s. Abb. 5 A,B).

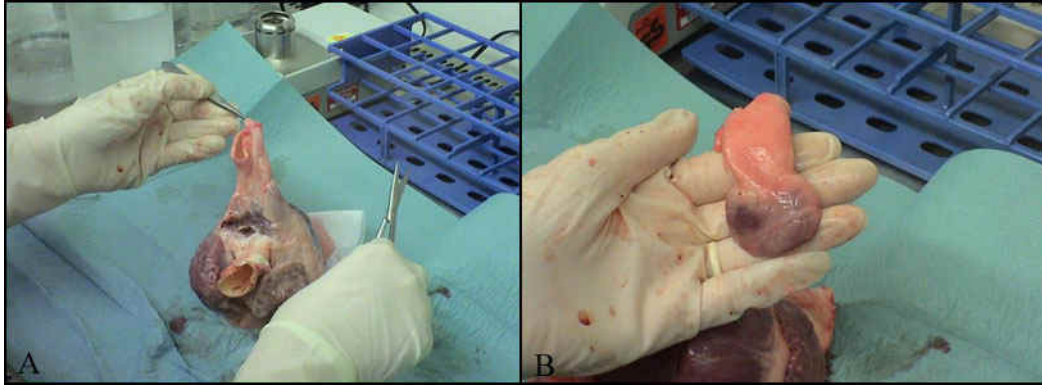


Abb. 5: **A)** Herauspräparieren der Pulmonalklappe mit angrenzender Pulmonalarterie; **B)** ein subvalvarer Muskelrand wird stehengelassen

Die herauspräparierten Klappen wurden erneut für 30 Minuten in Betaisodonnalösung inkubiert, dreimal in PBS gespült, in ein Gefäß mit ca. 80 ml PBS und 2 ml Antibiotikagemisch überführt (s. Abb. 6 A) und für 24 Stunden bei 4 °C gelagert. Es folgte die Dezellularisierung der Klappen durch Inkubation in 80 ml Trypsin/EDTA-Lösung unter ständigem Schütteln bei 37 °C und 5% CO₂ für 24 Stunden (s. Abb. 6 B). Anschließend erfolgte eine 24-stündige Auswaschung in 80 ml PBS und 2 ml Antibiotikagemisch auf einem Rüttelschüttler. Diese Waschung diente der Entfernung von Zelltrümmern aus dem Klappengewebe. Bis zur Besiedlung der Klappen erfolgte die Lagerung in Hank`s Lösung bei 4 °C.

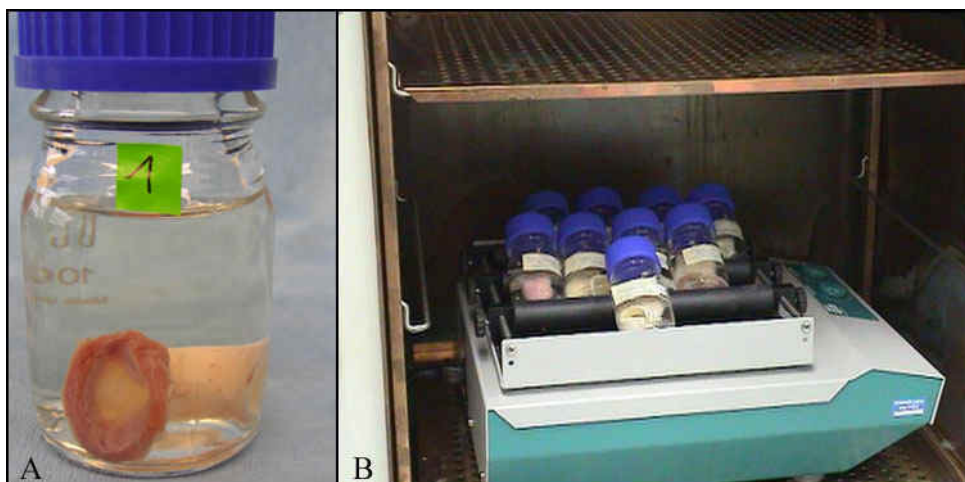


Abb. 6: **A)** Frisch herauspräparierte Herzklappe; **B)** Dezellularisierung der Herzklappen

3.2.4 Besiedlung der Herzklappen

Zur Besiedlung der Herzklappen wurden zuerst Myofibroblasten von acht T75 Flaschen mit Trypsin abgelöst und in 40 ml Medium aufgenommen. In dieser konzentrierten Zell-Lösung wurde die dezellularisierte Klappe 10 Minuten in einer 125 ml Glasflasche präinkubiert (s. Abb. 7 A). Anschließend wurde das Gefäß mit weiteren 80 ml Medium aufgefüllt und in einem Hybridofen bei 37°C zwei Tage unter langsamer Rotation inkubiert (s. Abb. 7 B).

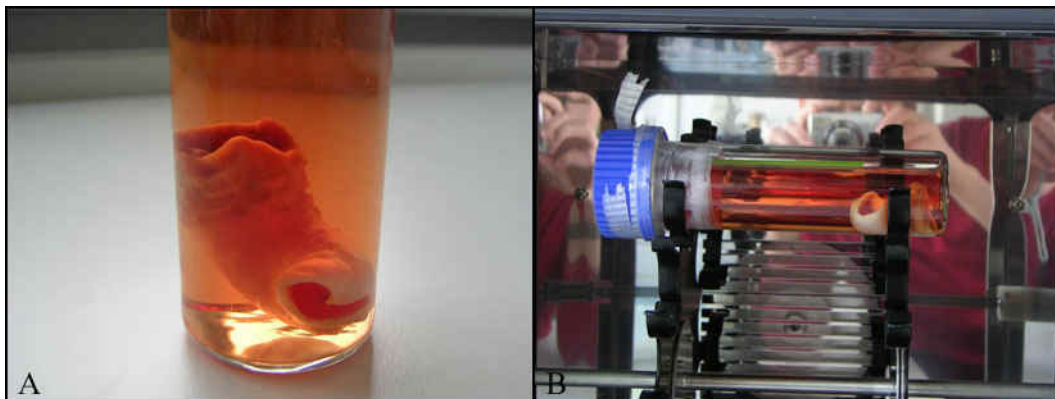


Abb. 7: **A)** Klappe in konzentrierter Zell-Lösung; **B)** Im Hybridofen ist die Klappe einer leichten Rotation ausgesetzt, um ein gleichmäßiges Absetzen der Zellen zu ermöglichen.

Nach dieser statischen Besiedlung wurden die Klappen in einer speziellen Halterung fixiert (s. Abb. 8) und für 16 Tage in einen Bioreaktor eingebaut (s. Abb. 9 A-D). Dabei handelt es sich um ein Mikroprozessor gesteuertes System. Durch abwechselnd wirkende Druck- und Vakuumkräfte wird über eine Membran im Reaktor befindliches Nährmedium in Bewegung gesetzt (s. Abb. 10). Durch einen Ventilmechanismus entstehen dabei zirkuläre, unidirektional gerichtete, pulsatile Fluss- und Druckkräfte (ca. 60/40 mmHg bei einer Frequenz von 1Hz). Die auf diese Weise generierten physikalischen Signale wirken auf die Klappen ein und stellen einen Proliferationsreiz für die Myofibroblasten dar. Dadurch wird eine gleichmäßige Migration der Zellen in das Klappengewebe bewirkt. Das Reaktorsystem kann komplett sterilisiert werden. Über die Zu- und Ableitung von einem CO₂-Luftgemisch und durch die Platzierung des Systems in einem Zellkulturschrank werden gleichbleibende Kulturbedingungen (37°C und 5% CO₂) sichergestellt.

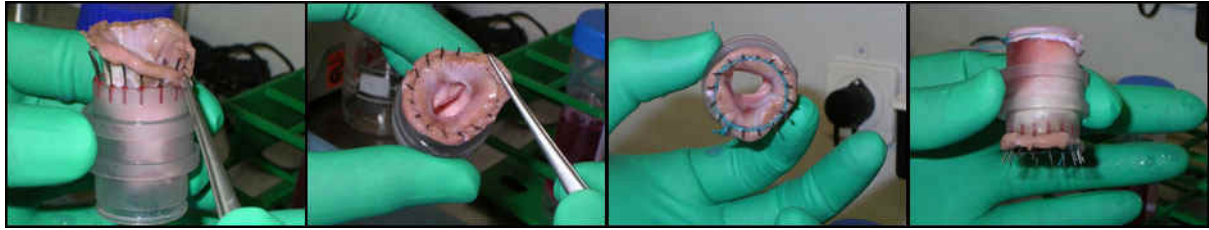


Abb. 8: Für die Applikation der physikalischen Druck und Flusskräfte im Bioreaktor wird die Klappe in einer speziellen Halterung fixiert.

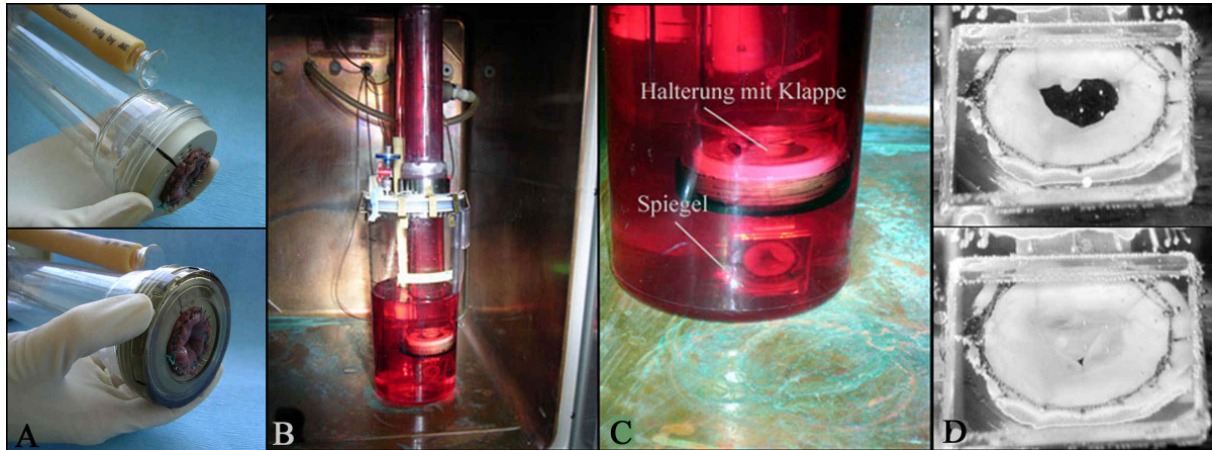


Abb. 9: A) Einbau der Klappe B) Bioreaktor; C) über einen Spiegel lässt sich die komplette Öffnung und Schließung der Klappe kontrollieren D)

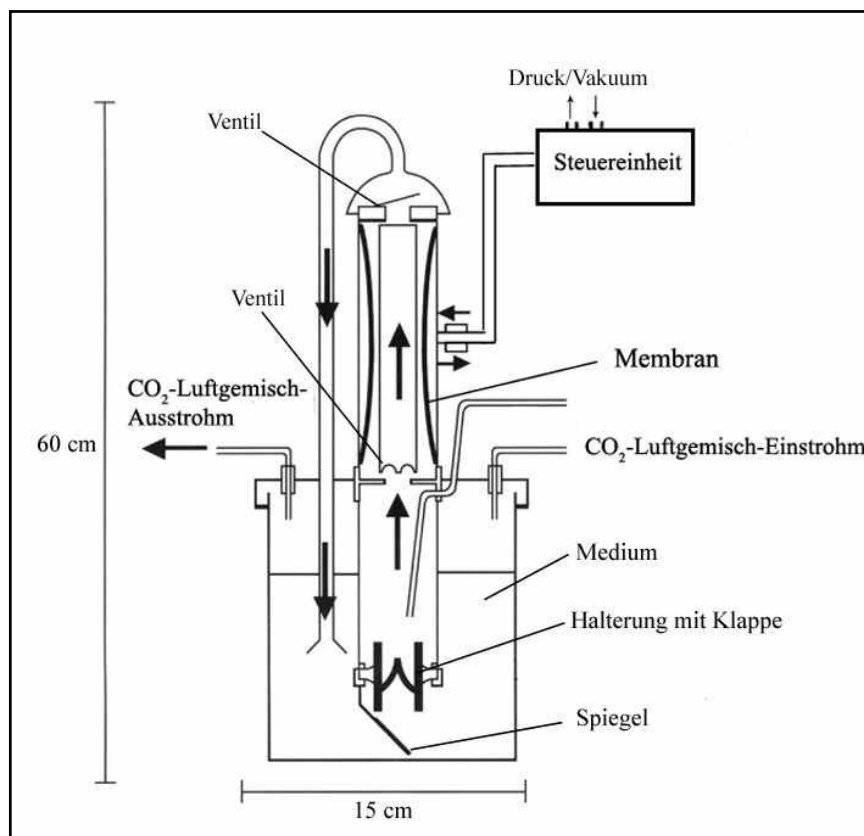


Abb. 10: Schematische Darstellung des Bioreaktors (Zeichnung modifiziert nach Stock).

Nach 6 und 12 Tagen wurden jeweils 20 ml FCS, 60µl FGF und 20 ml Penicillin-Streptomycin in den Bioreaktor hineingegeben. Nach 18 Tagen (2 Tage statische Kultur, 16 Tage dynamische Kultur im Bioreaktor) erfolgte die Besiedlung mit Endothelzellen. Dazu wurden die kultivierten Endothelzellen von drei T75 Flaschen abgelöst, in Medium aufgenommen und zusammen mit der Klappe in eine 125 ml Glasflasche gegeben. Eine Inkubation für zwei weitere Tage bei 37°C komplettierten die *in vitro* Prozesse. Es wurden für 10 Versuchstiere Herzklappen hergestellt. Dabei wurden die Klappen für zwei Versuchstiere nur mit Myofibroblasten und für zwei weitere Tiere nur mit Endothelzellen besiedelt. Die tissue engineerten Herzklappen wurden implantiert und nach 4, 8 und 12 Wochen explantiert (s. Tab. 8).

Tab. 8: Übersicht über Besiedlung der Herzklappen und geplante Implantationsdauer

Versuchstiere n=10	Besiedlung der Herzklappen mit	geplante Implantationsdauer
2 Tiere	Myofibroblasten	12 Wochen
2 Tiere	Endothelzellen	12 Wochen
2 Tiere	Myofibroblasten + Endothelzellen	12 Wochen
2 Tiere	Myofibroblasten + Endothelzellen	8 Wochen
2 Tiere	Myofibroblasten + Endothelzellen	4 Wochen

3.3 Operative Verfahren

3.3.1 Gefäßentnahme

Für die Gewinnung von Zellen zur Herstellung der Herzklappen wurde von jedem Versuchstier ein Segment der Arteria carotis communis unter sterilen Kautelen entnommen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nach Einleitung der Narkose mit Ketamin (30mg/kg) wurden die Tiere orotracheal intubiert und die Narkose durch kontrollierte Beatmung mit Halothan aufrechterhalten. In die linke Vena jugularis externa wurde eine großlumige Braunüle eingeführt. Die A. Carotis communis dextra wurde freipräpariert, kleinere Gefäßabgänge mittels Durchstechungsnaht mit Vicryl 2-0 (Ethicon) unterbunden. Anschließend wurde ein ca. drei Zentimeter langes Segment der Carotis ober- und unterhalb abgeklemmt und herausgeschnitten. Die Gefäßstümpfe wurden mittels Durchstechungsnaht (Vicryl 2-0) unterbunden und die Wunde mit einer fortlaufenden

Naht (Vicryl 2-0) verschlossen. Postoperativ erhielten die Tiere für drei Tage eine Antibiotikakombination aus Gentamicin (100mg 1x täglich) und Ampicillin (500mg 2x täglich). Zur Schmerzlinderung wurde Metamizol (50mg/kg 2x täglich) verabreicht.

3.3.2 Implantation

Die Implantation der Klappen erfolgte in Anlehnung an ein von S. Hilbert beschriebenes Modell (Hilbert et al. 1998) im Bereich der descendierenden Aorta (siehe Abb. 11).

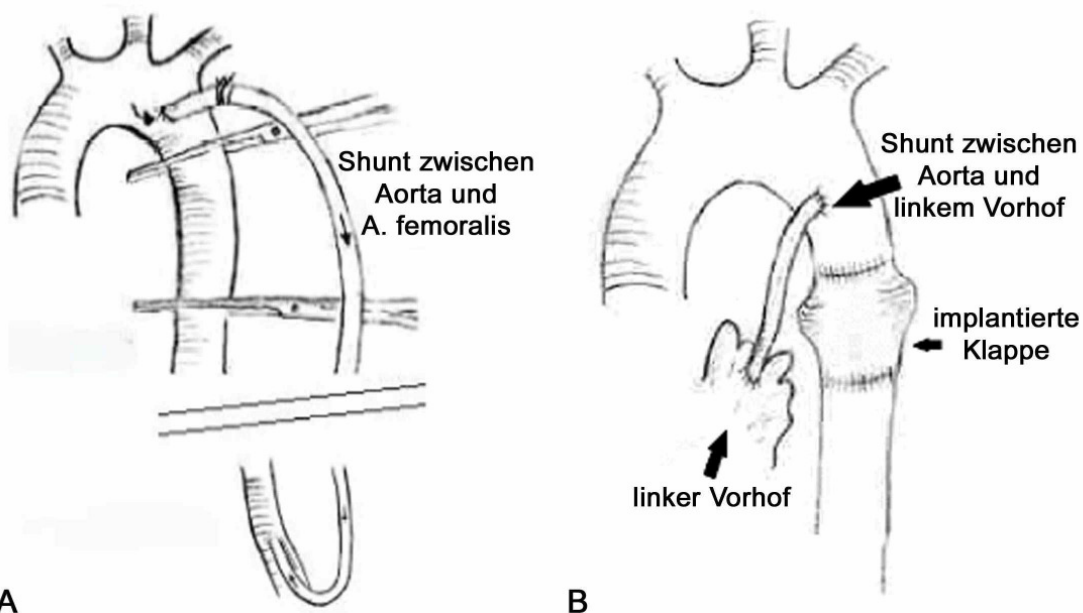


Abb. 11: A) Die Implantation der Klappe erfolgt im Bereich der descendierenden Aorta. **B)** Über eine PTFE-Prothese wird ein Shunt zwischen Aorta und linkem Vorhof geschaffen.

Nach der Einleitung der Narkose mit Ketamin (30mg/kg) wurden die Tiere intubiert und die Narkose durch kontrollierte Beatmung mit einem Halothan/Luftgemisch aufrechterhalten. In die linke Vena jugularis externa wurde eine großlumige Braunüle eingeführt. Zum Monitoring des perioperativen Blutdrucks wurde eine arterielle Kanüle in eine Ohrarterie (Ramus auricularis intermedius der A. auricularis caudalis) eingeführt. Die Überwachung der Sauerstoffsättigung während der Operation erfolgte über linguale Pulsoxymetrie und wurde durch Blutgasanalysen in regelmäßigen Abständen bestätigt. An der linken Leistenregion wurde ein Ast der Arteria femoralis superficialis freipräpariert und ebenfalls zum Blutdruckmonitoring verwendet (s. Abb. 12 A). In der rechten Leistenregion wurde die Arteria femoralis

freipräpariert (Abb. 12 B). Anschließend wurde eine laterale Thorakotomie im vierten Intercostalraum durchgeführt und die Aorta descendens freipräpariert und isoliert (Abb. 12 C). Nach dem partiellen Ausklemmen der Aorta mit Hilfe einer Satinsky-Klemme wurde ein 5 mm Stanzloch hergestellt. Nachfolgend wurde eine 5 mm Polytetrafluoroethylene Prothese (PTFE/ Gore-Tex) durch eine fortlaufende 5-0 Prolene-Naht mit dem ausgeklemmten Bereich der Aorta anastomosiert (Abb. 12 D).

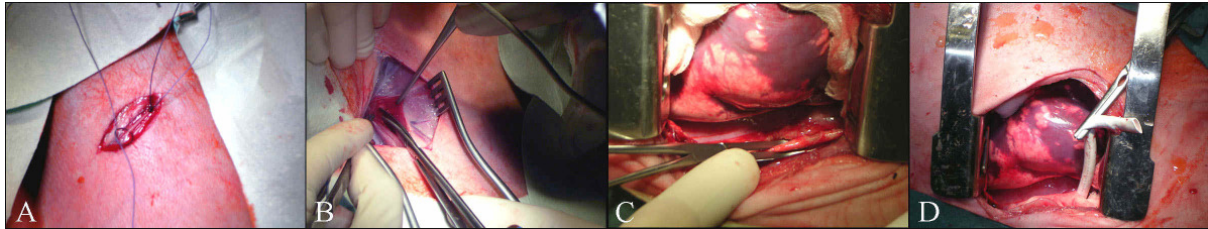


Abb. 12: **A)** Freilegung eines Astes der A. femoralis superfic. ; **B)** Darstellung der A. femoralis in der rechten Leistenregion; **C)** partiell ausgeklemmte Aorta; **D)** mit der Aorta anastomosierte PTFE Prothese

Nach systemischer Gabe von 10.000 IE Heparin wurde durch diese Prothese über eine zwischengeschaltete Rollerpumpe eine Verbindung zu der in der rechten Leistenregion freipräparierten Arteria femoralis gelegt (modifizierter GOTT-Shunt). Hierzu erfolgte eine Kanülierung der rechten Femoralarterie (12ch Kanüle) und Verbindung der PTFE-Prothese mit einem $\frac{1}{4}$ PU-Schlauch. Dieser wurde durch eine HLM (Herzlungenmaschine)-Rollerpumpe geleitet und ein Fluss von 1,5 l/min etabliert (s. Abb. 13 A-D).

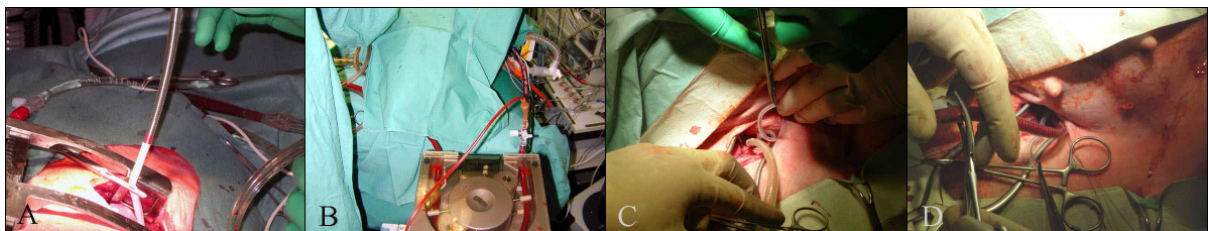


Abb. 13: **A)** Ausgehend von der Aorta wird ein Shunt über eine zwischengeschaltete **B)** Rollerpumpe zur rechten A. femoralis hergestellt **C),D)**.

Anschließend wurde die Aorta unterhalb des Shuntabganges doppelt abgeklemmt und ein ca. 2 cm breiter Aortenring herausgeschnitten. Durch den zuvor angelegten Shunt wurde die Durchblutung der unteren Körperhälfte sichergestellt. Nun erfolgte das Einnähen der tissue engineerten Klappe über zwei End zu End Anastomosen mit 5-0 Prolene fortlaufend (s. Abb. 14 A, B, C).

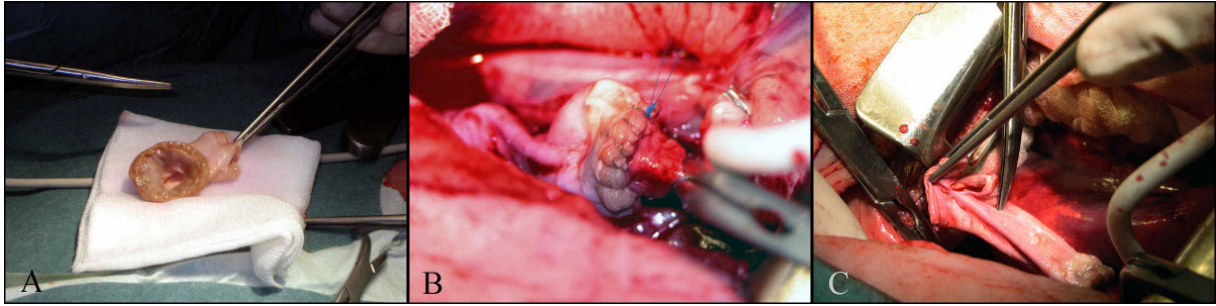


Abb. 14: **A)** TE-Klappe vor der Implantation; **B)** Proximale Anastomose; **C)** Beginn der distalen Anastomosierung

Nachfolgend wurden die Klemmen und der Umgehungskreislauf entfernt (s. Abb. 15 A). Nach dem partiellen Ausklemmen des linken Vorhofes wurde über die noch vorhandene PTFE-Prothese ein Shunt zwischen Aorta und dem linken Herzhohr angelegt (s. Abb. 15 B, C). Dieser Shunt dient zur Sicherstellung einer adäquaten systolischen und diastolischen Druckdifferenz und gewährleistet ein besseres Öffnen und Schließen der implantierten Klappe.

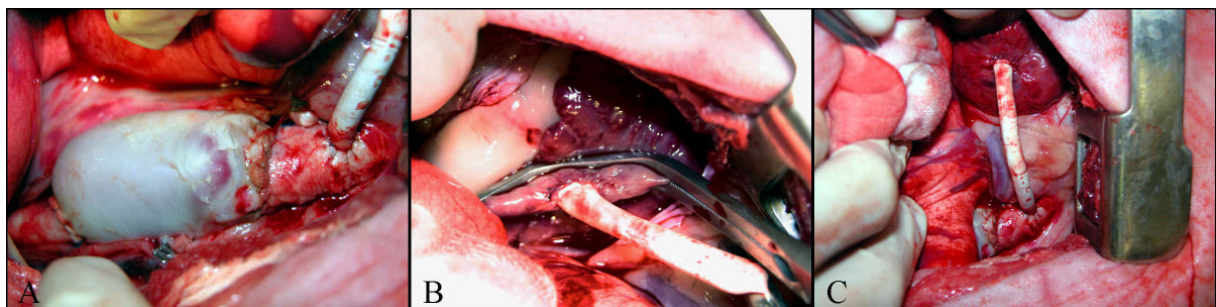


Abb. 15: **A)** Implantierte Klappe nach Öffnung der Klemmen; **B)** Zur Anlage des Shunts zwischen Aorta und linkem Vorhof, wird die PTFE-Prothese mit dem linken Herzhohr anastomosiert; **C)** Überblick über den OP-Situs

Nach Antagonisierung des Heparins durch 5000 IE Protamin erfolgte die Anlage einer Thoraxsaugdrainage und der schichtweise Verschluss des Thorax mit resorbierbarem Nahtmaterial. Postoperativ erhielten die Tiere 3 Tage lang eine Antibiotikakombination aus Gentamicin (100 mg 1x täglich) und Ampicillin (500 mg 2x täglich). Zur Analgesierung wurde Metamizol (50 mg/kg 2x täglich) verabreicht.

3.3.3 Explantation

Zur Explantation wurden die Schafe ebenfalls narkotisiert und intubiert. Der Brustkorb wurde durch eine laterale Thorakotomie entlang der bestehenden Narbe eröffnet, das Implantat freipräpariert und sonographisch beurteilt. Anschließend wurde das Versuchstier heparinisiert (10.000 IE) und durch eine Überdosis mit einer 16%-igen Pentobarbital-Natrium-Lösung (Nacoren/Merial, Deutschland) und nachfolgender Gabe einer Magnesiumsulfatlösung getötet. Die Aorta ober- und unterhalb des Implantats wurde abgeklemmt und mit einer Schere durchtrennt. Das entnommene Präparat wurde in Längsrichtung eröffnet und makroskopisch beurteilt. Die drei Klappentaschen wurden entlang ihrer Ränder getrennt, so dass man drei Präparatstreifen, bestehend aus der eigentlichen Tasche und dem dazugehörigen Gefäßsegment, erhielt (s. Abb. 16).

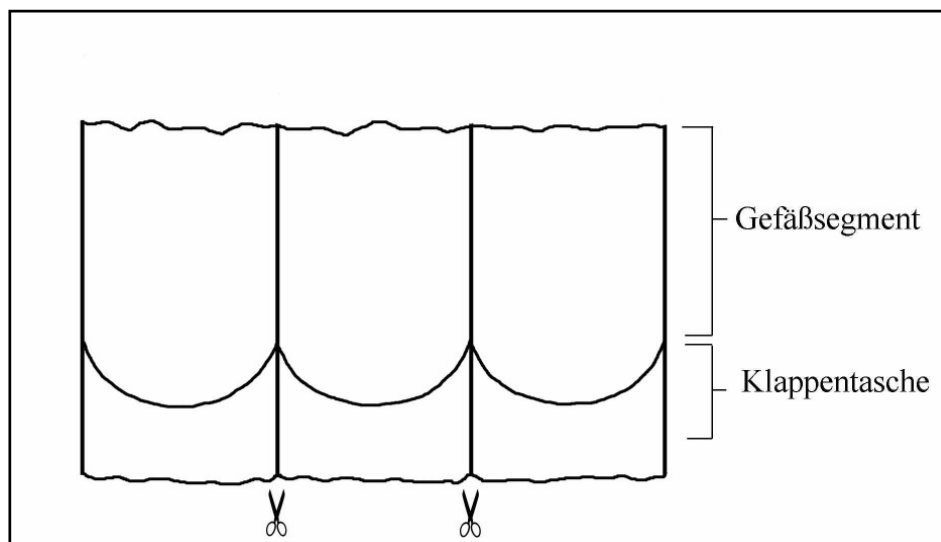


Abb. 16: Die in Längsrichtung eröffnete Klappe wird aufgeklappt und entsprechend der Darstellung in drei Teile getrennt.

Für die histologische und immunhistochemische Beurteilung wurden 2 Streifen zur Fixation für ca. eine Woche in 4%-iges Formalin gebracht und entsprechend weiterverarbeitet (s. 3.4.2). Die übrige Tasche wurde mit Hilfe der Scanning Elektronen Mikroskopie (SEM) beurteilt. Als Vergleichsgewebe wurden native Pulmonalklappen vom Schwein und Aortenklappen vom Schaf verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Klappen von Schweineherzen (Schlachthof Jena) und den Herzen der Versuchstiere herauspräpariert.

3.4 Untersuchungen

3.4.1 Probenvorbereitung für Scanning Elektronen Mikroskopie (SEM)

Die Proben für die SEM wurden im Institut für Ultrastrukturforschung der FSU Jena mit Hilfe eines Raster-Elektronen Mikroskops (Stereoscan Leo 1450 VP) untersucht. Die Vorbereitung der Proben erfolgte nach folgenden Schritten:

- Waschen in 5% glucosehaltigen Cacodylatpuffer (ph 7,4)
- Fixierung in einer 3% Glutaraldehyd-Cacodylatpufferlösung (ph 7,4) für zwei Stunden bei 4 °C
- zwei mal 30 min Waschen in 5% glucosehaltigen Cacodylatpuffer (ph 7,4)
- Entwässern in Alkohol (50%, 70%, 90%, abs. Alkohol)
- kritische Punkttrocknung (Critical Point Dryer CPD 030, BAL-TEC)
- Goldbedampfung in Argonatmosphäre (Sputter coater SCD 005, BAL-TEC)

3.4.2 Probenvorbereitung für Histologie und Immunhistochemie

Die in Formalin fixierten Proben wurden im Institut für Anatomie II der FSU Jena verarbeitet. Es erfolgte eine Entwässerung der Präparate unter einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffin. Nachfolgend wurden 7-8 µm dünne Schnitte angefertigt und auf adhäsiven Objekträgern (SuperFrost-Plus, Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig) aufgebracht und nach histologischen und immunhistochemischen Methoden weiterbearbeitet. Die fertigen Präparate wurden mit Licht- und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Zur Dokumentation wurden digitale Aufnahmen angefertigt. Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgte unter Verwendung von Photoshop 5.0.

3.4.3 Histologische Färbungen

Für die histomorphologische Beurteilung der Präparate wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Färbungen entsprechend nach Romeis (1989) durchgeführt.

Tab. 9: Verwendete histologische Färbungen

Färbung	Was wird angefärbt
Hematoxylin-Eosin (HE)	Zellkerne: blau, Zytoplasma: blassrot, kollagene Fasern: rot, elastische Fasern: blassrosa
Weigert's Resorcin-Fuchsin-Färbung	elastische Faserelemente: schwarzblau
Movat-Pentachrom	Kollagen: gelb; elastische Fasern: rot; saure Glykosaminoglykane: hellblau; Zytoplasma: rötlich, Zellkerne: blauschwarz
Von Kossa (Gegenfärbung mit Pikrofuchsinlösung)	mineralisierte Gewebeanteile: einheitlich schwarz; Kerne: schwarzbraun; kollagene Fasern: leuchtend rot

Die fertigen Schnitte wurden lichtmikroskopisch mit einem Axiovert 100 (Zeiss, Jena) analysiert. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein Binokular (Stemi 2000C, Zeiss, Jena) verwendet. Zur Dokumentation wurden Bilder mit einer Axiocam (Zeiss, Jena, Germany) digital aufgenommen.

3.4.4 Immunhistochemie

Zur Charakterisierung der zellulären und extrazellulären Elemente wurden folgende Antikörper verwendet:

Antikörper gegen glattmuskuläres Aktin (α -SMA):

Bezeichnung: Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, (Sigma)

Glattmuskuläres Aktin ist ein Zytoskelettprotein, das bei Bewegungsprozessen in Zellen (z.B. Kontraktion, Phagozytose, Zytokinese) eine wichtige Funktion besitzt. So kommt es vor allem bei Zellen mit glattmuskulären Eigenschaften vor. Vor Aufbringung des Antikörpers wurden die Schnitte je zwei mal für fünf Minuten in einer Mikrowelle bei 80 Watt und 80°C inkubiert. Der Antikörper wurde in einer Gebrauchsverdünnung von 1:400 verwendet.

Antikörper gegen Vimentin:

Bezeichnung: Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Clone V9, (DAKO)

Vimentin ist ein Intermediärfilamentprotein im Zytoskelett von Wirbeltierzellen. Es besitzt eine hohe Spezifität für Zellen mesenchymalen Ursprungs. Vor Anwendung des Antikörpers erfolgte eine Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle (s. α -SMA). Die Gebrauchsverdünnung betrug 1:50.

Antikörper gegen Von Willebrand Faktor (vWF):

Bezeichnung: Rabbit Anti-Human Von Willebrand Faktor, (DAKO)

Der von Willebrand Faktor wird zur Identifikation von endothelialen Zellen verwendet. Auch hier erfolgte eine Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle (s. α -SMA). Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 angewendet.

Antikörper gegen glattmuskuläres Caldesmon:

Bezeichnung: Monoclonal Mouse Anti-Caldesmon (Smooth), (Sigma)

Caldesmon ist ein Protein, das in glatten Muskelzellen und anderen Zellen, mit glattmuskulären Eigenschaften (z.B. Myofibroblasten, myoepitheliale Zellen) gefunden werden kann. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 angewendet.

Antikörper gegen Kollagen Typ I:

Bezeichnung: Polyclonal Antibody to Collagen Type I, Rabbit (Acris)

Der Antikörper wurde in einer Gebrauchsverdünnung von 1:200 verwendet.

Antikörper gegen Kollagen Typ III:

Polyclonal Antibody to Collagen Typ III, Rabbit (Acris)

Die Gebrauchsverdünnung betrug 1:200.

Zur Detektion der Primärantikörper wurden überwiegend Immunfluoreszenz-Techniken mit Fluorescein-Isothiocyanate (FITC) konjugierten Sekundärantikörpern eingesetzt. Für den Primärantikörper gegen vWF wurde ein FITC gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper (FITC-Conjugated Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins, DAKO) verwendet, für die Primärantikörper gegen α -SMA, Vimentin und Caldesmon, ein

FITC gekoppelter Anti-Maus Antikörper (Rabbit Anti-Mouse IgG FITC Conjugated Sigma). Nach erfolgter Antikörpermarkierung wurden die Präparate mit VECTASHIELD mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame /CA, USA) eingedeckt. Mit dem darin enthaltenen DAPI (4',6-diamindino-2-phenylindol) wurde gleichzeitig DNS sichtbar gemacht. Durch Austausch des Filters am Fluoreszenzmikroskop konnten so die Zellkerne im Gewebe leuchtend Blau zur Darstellung gebracht werden. Die fertigen Schnitte wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axioplan 2 imaging, Zeiss, Jena) untersucht. Mit Hilfe einer angeschlossenen Kamera (AxioCam HRc, Zeiss, Jena) wurden an repräsentativen Stellen digitale Aufnahmen gemacht. Die Detektion der Antikörper gegen Kollagen 1 und 3 erfolgte nicht mit FITC konjugierten Sekundärantikörpern, sondern mit Hilfe eines ABC-Kits (VECTASTAIN ABC-KIT Linaris Biologische Produkte GMBH, Wertheim) und Jenchrom (JenchrompxblG, Fa. MoBiTec). Die fertigen Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop (Axiovert S100) beurteilt. Zu allen verwendeten Antikörpern wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen der Primärantikörper weggelassen wurde.

4. Ergebnisse

4.1 Versuchsverlauf

Insgesamt wurden bei 10 Versuchstieren Implantationen durchgeführt. Die Eingriffe verliefen durchweg komplikationslos und waren nach durchschnittlich 3 Stunden beendet. Bei einem Tier kam es intraoperativ zu einem Herzstillstand. Nach zunächst erfolgreicher Reanimation verstarb es jedoch ca. 5 Stunden nach Beendigung der Operation an Lungenversagen. Ein weiteres Tier verstarb nach ca. einer Stunde durch einen Einriss im Gefäßsegment der implantierten Klappe. Die übrigen acht Tiere konnten noch am Operationstag der Gruppenhaltung zugeführt werden. Der weitere Versuchsverlauf gestaltete sich unauffällig. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die verschiedenen Zellbesiedlungen und den Explantationszeitpunkt der jeweiligen Klappen.

Tab. 10 Überblick über Besiedlung der Herzklappen und Zeitpunkt der Explantation

Versuchstier	Besiedlung	Explantation nach
1	Myofibroblasten	12 Wochen
2	Myofibroblasten	12 Wochen
3	nur Endothelzellen	12 Wochen
4	nur Endothelzellen	12 Wochen
5	Myofibroblasten u. Endothelzellen	12 Wochen
6	Myofibroblasten u. Endothelzellen	5 Stunden
7	Myofibroblasten u. Endothelzellen	8 Wochen
8	Myofibroblasten u. Endothelzellen	8 Wochen
9	Myofibroblasten u. Endothelzellen	1 Stunde
10	Myofibroblasten u. Endothelzellen	4 Wochen

4.2 Sonographische Beurteilung der Implantate

Bei einer unmittelbar vor der Explantation durchgeführten Sonographie konnten bei allen Versuchstieren rudimentäre Klappentaschen dargestellt werden. Eine Bewegung der Taschen konnte jedoch nicht mehr festgestellt werden (s. Abb. 17). Ein funktionierender Blutfluss innerhalb des zwischen Aorta und linkem Herzvorhof angelegten Shunts konnte durch eine dopplersonographische Untersuchung bei allen Tieren nachgewiesen werden.

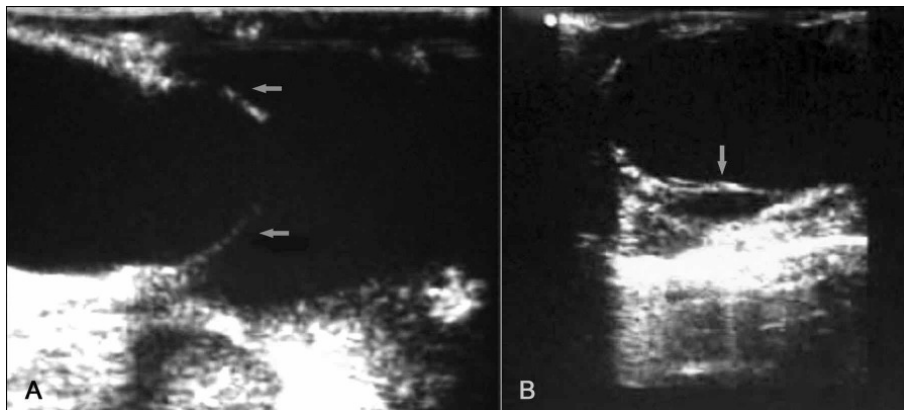


Abb. 17: Darstellung einer implantierten Klappe mittels Sonographie (Taschen durch Pfeile markiert) **A)** im sagittalen Schnittbild, **B)** im transversalen Schnittbild

4.3 Makroskopische Beurteilung der Präparate

Die nach 4, 8 bzw. 12 Wochen explantierten Präparate wiesen äußerlich moderate Verwachsungen mit ihrer Umgebung auf. Bei den beiden vorzeitig verstorbenen Tieren waren die luminalen Oberflächen im Bereich des Implantates mit multiplen feinen Thromben überzogen. Dagegen waren sowohl die proximal als auch distal angrenzenden nativen Aortenabschnitte frei von thrombotischem Material (s. Abb. 18 D). Das nach einer Stunde postoperativ verstorbene Tier zeigte zusätzlich einen Einriss im Bereich des Gefäßsegmentes der Klappe. Bei den mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Klappen zeigten sich zu allen weiteren Explantationszeitpunkten glatte thrombenfreie Oberflächen (s. Abb. 18 A,B,C). Die Taschen erschienen mit einer entsprechend der Implantationsdauer zunehmenden Tendenz verdickt, verkürzt und degeneriert. Die nur mit Myofibroblasten besiedelten Klappen zeigten, trotz Heparinisierung, einen Thrombensaum entlang der

Oberfläche, der sowohl das Gefäßsegment, also auch die Taschen unregelmäßig überzog (s. Abb. 18 E). Auch hier erschienen die Taschen verkürzt, degeneriert und stärker verdickt als bei allen andern Präparaten. Die Oberfläche der nur mit Endothelzellen besiedelten Präparate war ebenfalls glatt und frei von Thromben. Auch hier wirkten die Taschen stark degeneriert, verkürzt und verdickt.

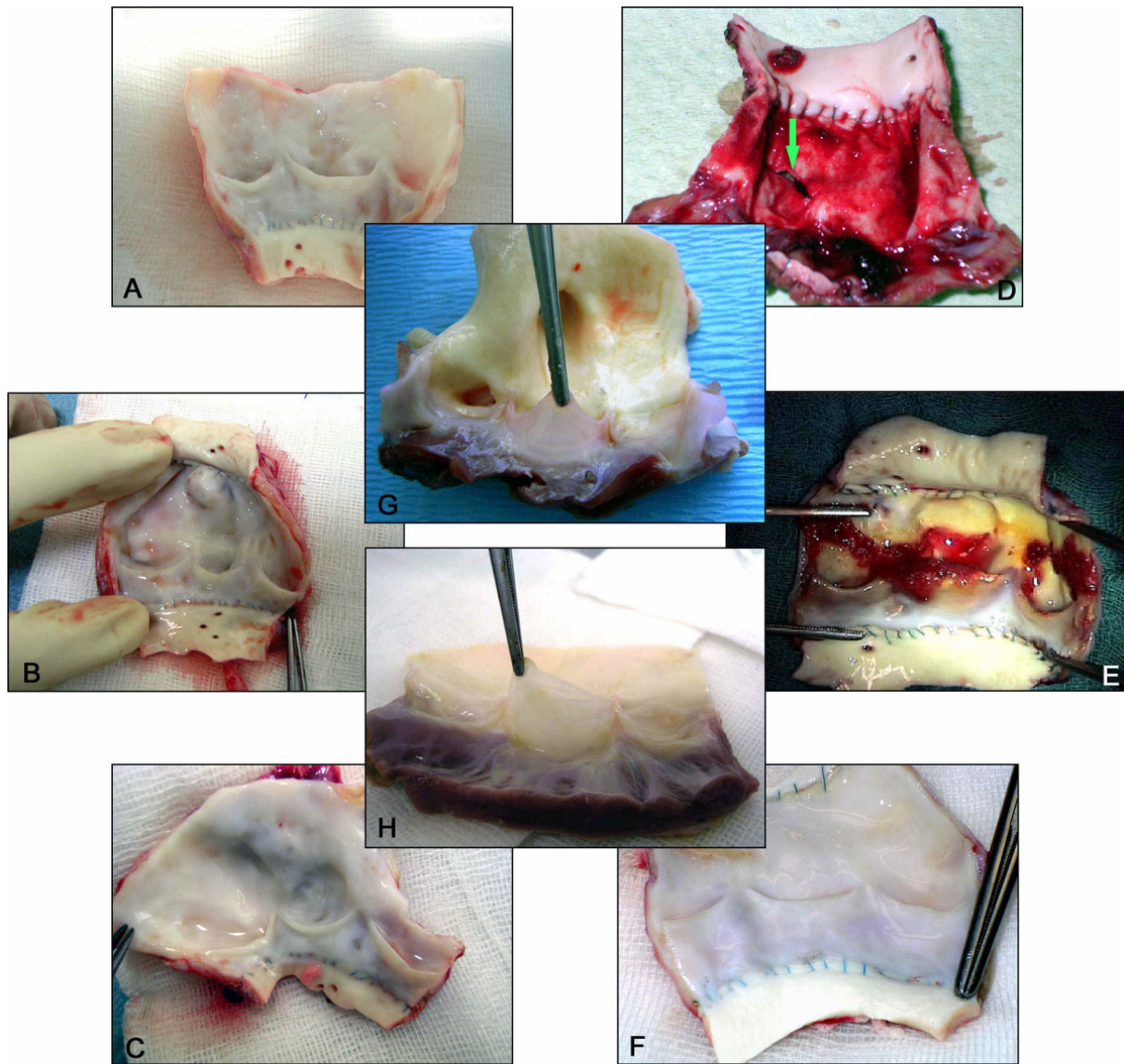


Abb. 18: Fotos der explantierten Präparate. **A,B,C,D)** mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelte TE-Klappen; **A)** nach 4 Wochen *in vivo*; **B)** nach 8 Wochen *in vivo*; **C)** nach 12 Wochen *in vivo*; **D)** nach 1h *in vivo* (Pfeil zeigt Einriss im Gefäßsegment der Klappe); **E)** nur mit Myofibroblasten besiedelte Klappe nach 12 Wochen *in vivo*; **F)** nur mit Endothelzellen besiedelte Klappe 12 Wochen *in vivo*; **G)** Aortenklappe vom Schaf; **H)** Pulmonalklappe vom Schwein

4.4 Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung der Präparate

Vor der Besiedlung mit Myofibroblasten und Endothelzellen wiesen die durch Trypsin/EDTA-Behandlung dezellularisierten Klappen komplett zellfreie Oberflächen auf. Es kamen nur wellenförmig angeordnete Fasermassen zum Vorschein (s. Abb. 19 B). Nach erfolgter Besiedlung mit Myofibroblasten und Inkubation im Bioreaktor konnten durch die Rasterelektronenmikroskopie gleichförmig ausgerichtete spindelförmige Zellverbände mit dazwischenliegender extrazellulärer Matrix dargestellt werden (s. Abb. 19 C). Nach weiterer Besiedlung der Klappen mit Endothelzellen war die Oberfläche der Klappen mit einem konfluenten Zellverband bedeckt (s. Abb. 19 D). Nach abgeschlossener *in vivo* Phase zeigten die mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Klappen im Rasterelektronenmikroskop auf der dem Blutstrom zugewandten Seite eine konfluente Zellschicht. Die Zellen besaßen eine längsförmige Ausrichtung und die für Endothelzellen typische Pflastersteinmorphologie (s. Abb. 19 F). Die Zellen wiesen ein im Vergleich zu nativen Klappen (s. Abb. 19 A,E) vermehrten Mikrovillibesatz auf. Die mit Endothelzellen besiedelten Klappen zeigten ebenfalls eine solche teppichartige Auskleidung mit Zellen, die aber durch einen geringeren Besatz mit Mikrovilli gekennzeichnet war (s. Abb. 19 G). Bei den nur mit Myofibroblasten besiedelten Klappen ergab sich ein sehr uneinheitliches Bild der Oberfläche, welches das makroskopische Bild widerspiegelte. Teilweise waren Areale mit konfluenter Zellschicht zu finden, die an manchen Stellen von Fibrinbelägen und darin verfangenen Erythrozyten überlagert wurden (s. Abb. 19 H). Es gab aber auch Stellen ohne zelluläre Bedeckung, sowie Areale mit massiven Verklumpungen von Fibrinfäden und Erythrozyten, die dem Bild eines thrombotischen Prozesses entsprachen.

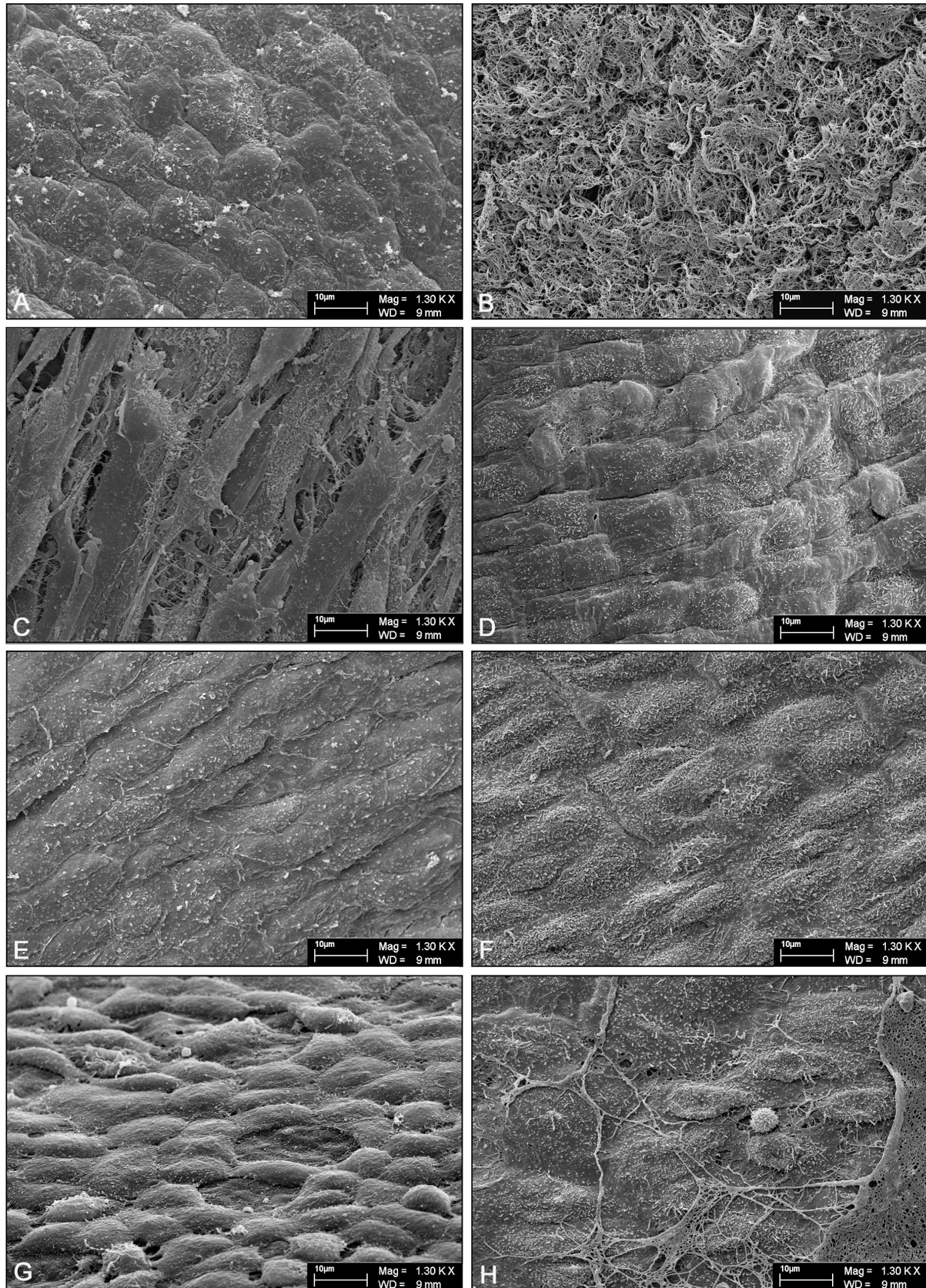


Abb. 19: SEM Oberflächenaufnahmen. Dargestellt ist jeweils die dem Blutstrom zugewandte Seite (Ventrikularis). **A)** Pulmonalklappe vom Schwein **B)** dezellularisierte Pulmonalklappe vom Schwein **C)** TE-Klappe nach Besiedlung mit Myofibroblasten (*in vitro*) **D)** TE-Klappe nach Besiedlung mit Endothelzellen (*in vitro*) **E)** Aortenklappe vom Schaf **F)** mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelte TE-Klappe (*in vivo*) **G)** mit Endothelzellen besiedelte TE-Klappe (*in vivo*) **H)** mit Myofibroblasten besiedelte TE-Klappe (*in vivo*)

4.5 Histologische und immunhistochemische Beurteilung

4.5.1 Allgemeiner morphologischer Überblick

Im histologischen Bild zeigte sich eine massive Umhüllung der ursprünglichen Klappentaschen mit neugebildetem Gewebe. Durch diese „neointimale“ Überwucherung entstand makroskopisch der Eindruck von verkürzten und verdickten Taschen. Im Vergleich zu einer nativen Klappe haben die ursprünglichen Klappenstrukturen, die im Inneren dieser Gewebsummantelung abgegrenzt werden können, jedoch nichts von ihrer eigentlichen Länge verloren (s. Abb. 20). Im Schnittbild der Klappe wird zwischen einer luminalen und einer peripheren Seite unterschieden. Die luminale Seite entspricht dem Teil der Klappe, die im direkten Kontakt mit dem Blutstrom steht. Die periphere Seite stellt die äußere, vom Blutstrom abgewandte Seite dar.

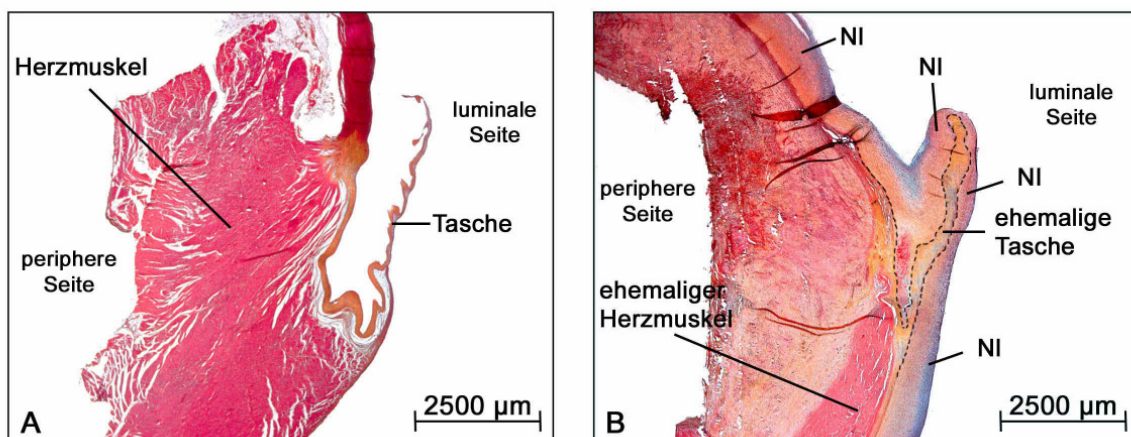


Abb. 20: Histologische Schnitte in Movat Pentachrome-Färbung einer (A) nativen Aortenklappe vom Schaf und (B) einer TE-Klappe nach 4-wöchiger Implantation (NI= Neointima; die gestrichelte Linie deutet die ehemalige Tasche an)

4.5.2 Beurteilung der zellulären Besiedlung und allgemeinen Morphologie

Durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA gelang eine nahezu vollständige Dezellularisierung der Herzklappen. Lediglich im Bereich des Herzmuskels waren noch vereinzelte Zellen und Zelltrümmer erkennbar. Die drei Hauptschichten der Taschen, bestehend aus Fibrosa, Spongiosa und der Ventrikularis, wie sie bei einer nativen Aortenklappe vorkommen, blieben weitgehend erhalten (s. Abb. 21 A-F).

Bei den Präparaten der vorzeitig verstorbenen Tiere konnte eine erfolgreiche Wiederbesiedlung der Klappentaschen mit einem gleichmäßigen und tiefen Eindringen der Zellen in die Klappenmatrix demonstriert werden (s. Abb. 21 G, H). Dagegen erfolgte im Gefäßsegment der Klappe nur eine oberflächliche Ansiedlung von Zellen (Abb. 21 I). Die luminalen Oberflächen waren bei diesen Präparaten über weite Teile mit thrombotischem Material überzogen.

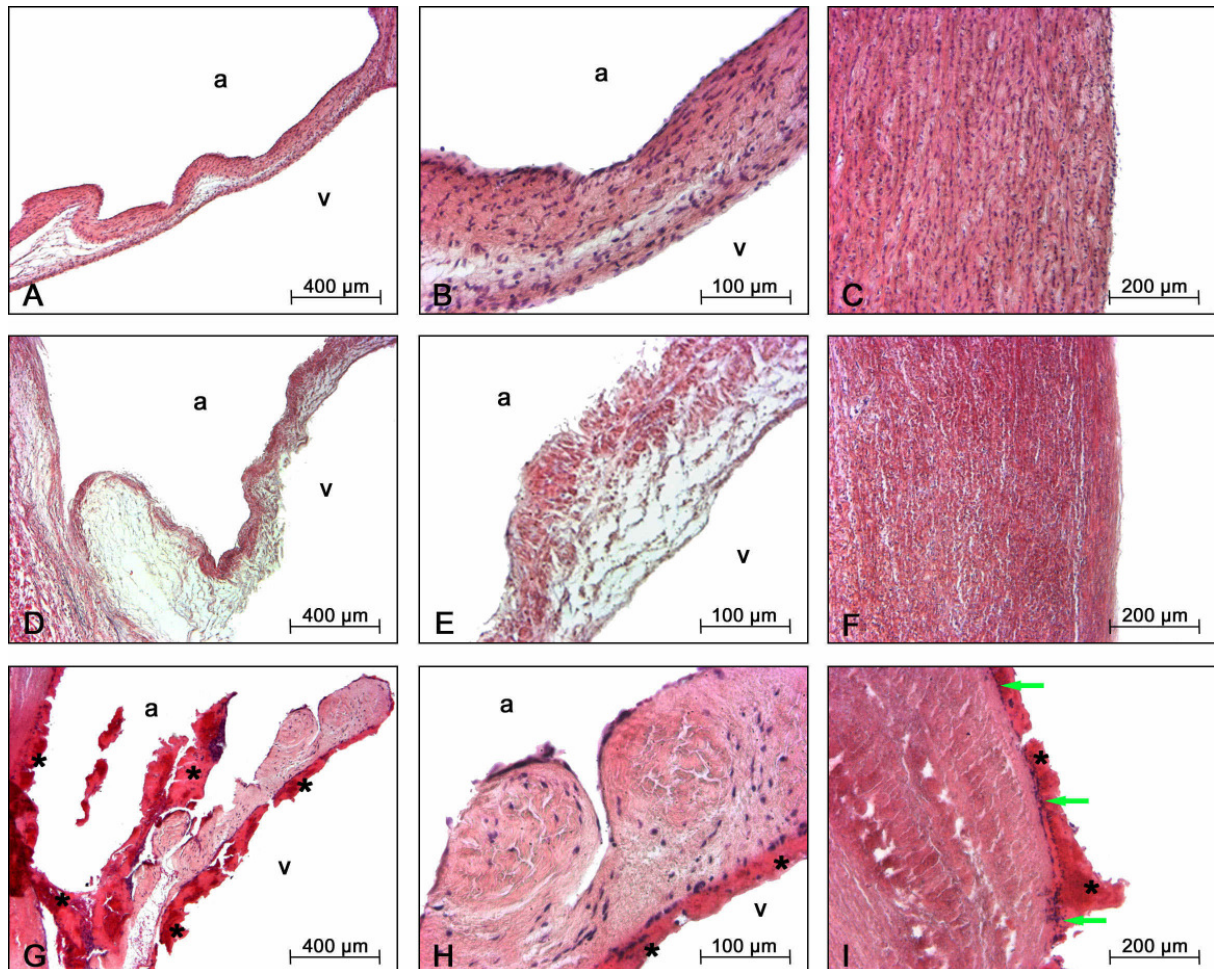


Abb. 21: Histologische Schnitte in HE-Färbung: (A-C) native Aortenklappe vom Schaf, (D-F) dezellularisierte Pulmonalklappe vom Schwein, (G-I) mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelte Klappe nach einer Stunde *in vivo*; (C,F,I) Ausschnitt vom Gefäßsegment der jeweiligen Klappen; (*) thrombotisches Material, (a) Arterialis (Blutausstromseite), (v) Ventrikularis (Bluteinstromseite), (grüner Pfeil) oberflächliche Ansiedlung von Zellen

Bei den mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Präparaten war nach 4 Wochen *in vivo* sowohl die Tasche als auch das Gefäßsegment durch eine Neointima ausgekleidet. Die Tasche wies eine kontinuierliche Besiedlung mit Zellen auf, die jedoch weniger dicht erschien, als im angrenzenden neointimalen Gewebe (s. Abb. 22 A,B). Mit zunehmender Implantationsdauer war ein steigender Vitalitäts-

und Integritätsverlust des Gewebes im Bereich der ehemaligen Tasche erkennbar. Nach 12 Wochen *in vivo* zeigte sich an dieser Stelle nur noch nekrotisches Material mit aufgequollenen, avitalen Fasern ohne zellulären Besatz (s. Abb. 22 D, E). Im Zentrum des Gefäßsegmentes zeigte sich bei allen Präparaten ein unregelmäßiger zellfreier Streifen (Abb. 22 C, F).

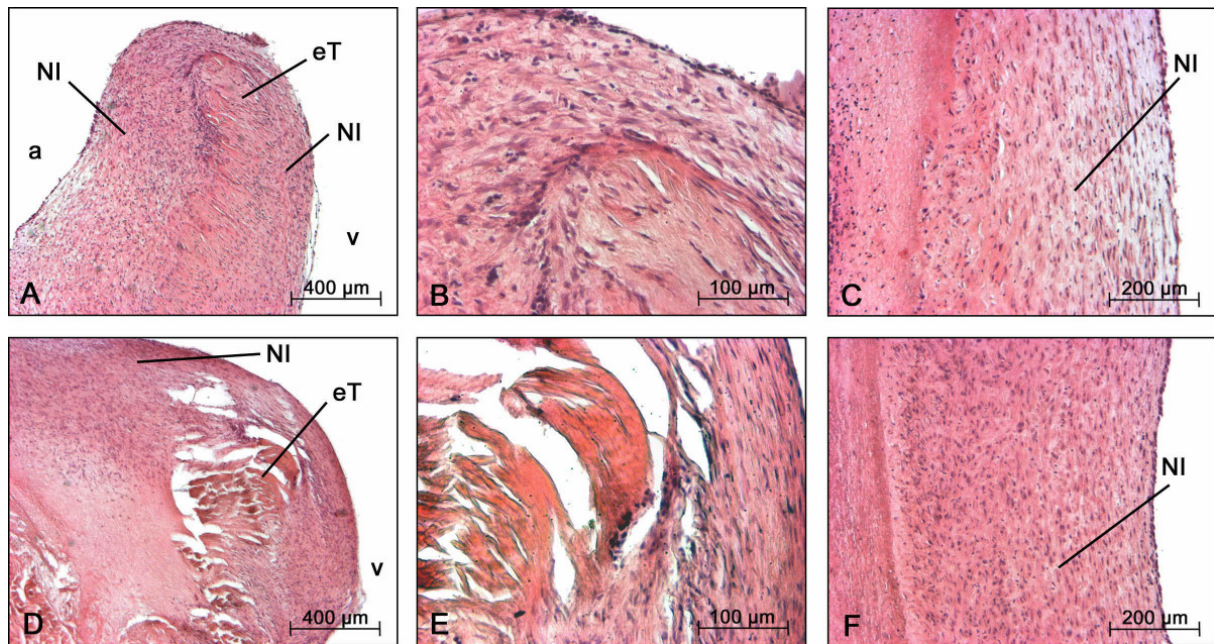


Abb. 22: Histologische Schnitte in HE-Färbung: mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelte Herzklappen (**A-C**) nach 4 Wochen *in vivo*, (**D-F**) nach 12 Wochen *in vivo*, (**C,F**) Ausschnitt aus dem Gefäßsegment der jeweiligen Klappe; (eT) ehemalige Tasche, (NI) Neointima, (a) Arterialis (Blutausstromseite) (v) Ventrikularis (Bluteinstromseite)

Die nur mit Endothelzellen besiedelten Klappen zeigten ebenfalls eine kontinuierliche Überwucherung mit Neointima (s. Abb. 23 D-F), die aber im Vergleich zu den mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Klappen weniger mächtig erschien (s. Abb. 23 A-C). Im Bereich der ursprünglichen Tasche waren neben überwiegend zellfreien sklerotischen Arealen auch Stellen mit teilweiser zellulärer Durchbauung zu erkennen. Im Zentrum des Gefäßsegmentes bestand ebenfalls ein zellfreier Gewebstreifen, der aber erheblich breiter war, als bei den bisher beschriebenen Präparaten. Dieser war zum Lumen hin durch eine glatt angrenzende Neointima überzogen. Abluminal grenzte ein unregelmäßig verlaufendes Band mit erhöhter Zellkonzentration an, welches sich lakunenartig in die zellfreien Bereiche einstülpte. Daran schloss sich nach Außen hin ein der Neointima ähnliches homogenes Gewebe an. Die nur mit Myofibroblasten besiedelten Präparate zeigten ein vollkommen

anderes Bild (s. Abb. 23 G-I). Von der ehemaligen Tasche war nur noch ein schmaler zellfreier, sklerotischer Streifen zu erkennen, der an den meisten Stellen in massive Thrombusformationen eingebettet war. Zwar bestand auch hier stellenweise eine neointimale Auskleidung, jedoch war diese nur sehr schmal und diskontinuierlich ausgeprägt. Teilweise fanden sich fließende Übergänge zwischen Neointima und Thrombusformationen. In verschiedenen Schnittebenen waren innerhalb der Thromben beginnende bindegewebige Umorganisationsprozesse zu erkennen, die zu einem neointimaähnlichen Gewebe führten.

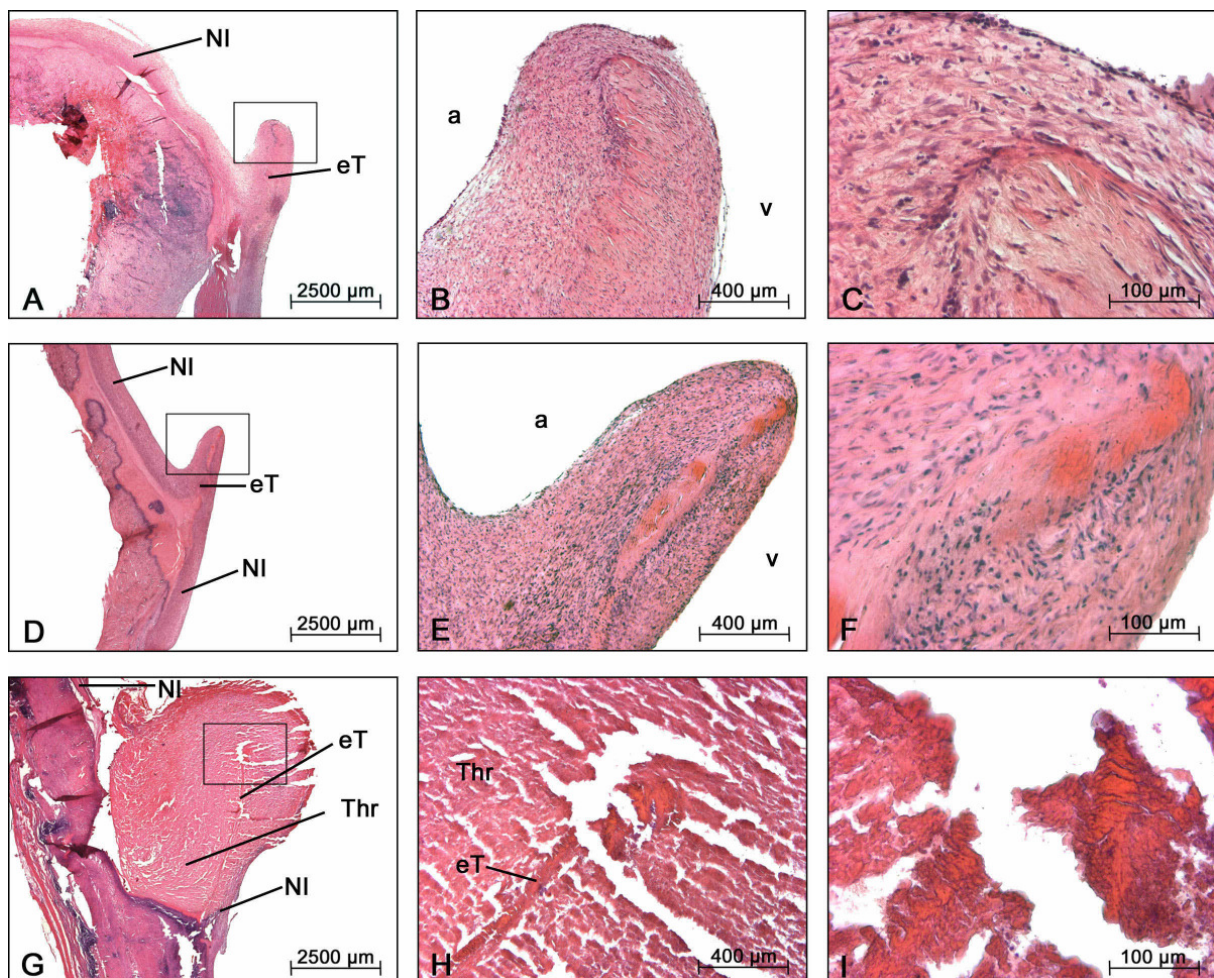


Abb. 23: Histologische Schnitte in HE-Färbung: (A-C) mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelte Herzklappe, (D-F) mit Endothelzellen besiedelte Herzklappe, (G-I) mit Myofibroblasten besiedelte Herzklappe: (eT) ehemalige Tasche, (NI) Neointima, (Thr) Thrombusformation, (a) Arterialis (Blutausstromseite), (v) Ventrikularis (Bluteinstromseite)

Vor allem in den peripheren, abluminalen Bereichen der Präparate ließen sich fokale Ab- und Umbauprozesse mit überwiegend lymphozytärer Infiltration des Gewebes und teilweise vorkommenden mehrkernigen Riesenzellen erkennen (s. Abb. 24 A-C). Teilweise gestalteten sich diese Zellanhäufungen als bandförmig verlaufende

Vernarbungszonen mit lakunären Einstülpungen in denen, wie es schien, ursprüngliches Klappengewebe abgebaut und durch neues Bindegewebe ersetzt wurde (s. Abb. 24 D-E). Diese Erscheinungen waren besonders ausgeprägt, bei den Präparaten mit 8 bzw. 12-wöchiger Implantationsdauer.

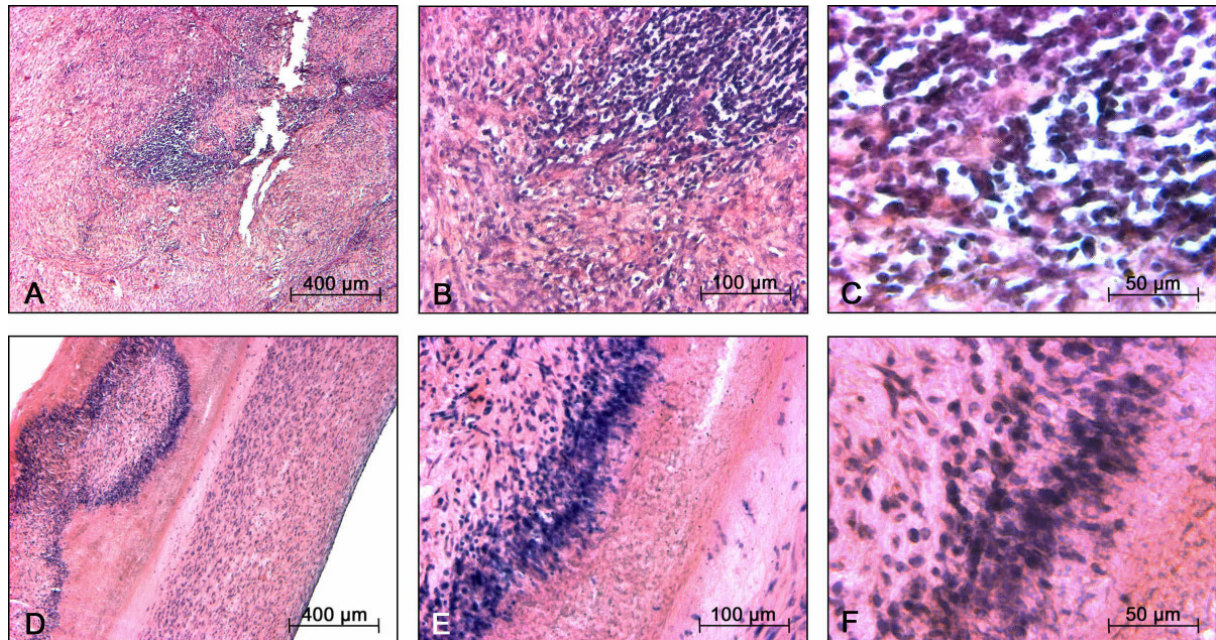


Abb. 24: Histologische Schnitte in HE-Färbung: **(A-C)** fokale lymphozytäre Zellinfiltrationen bei einer mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Klappe nach 4 Wochen *in vivo*, **(D-F)** bandförmig verlaufende Zellinfiltrationen bei einer mit Endothelzellen besiedelten Klappe nach 12 Wochen *in vivo*.

Anhäufungen von Entzündungszellen waren besonders häufig in der Nähe von Blutgefäßen zu finden, die mit zunehmender Implantationsdauer vermehrt in den abluminalen Abschnitten der Präparate anzutreffen waren. Nach 4 Wochen *in vivo* ließen sich in den peripheren Bereichen Zeichen von beginnender Vaskularisierung mit einsprossenden Kapillaren erkennen (s. Abb. 25 A,B). Schon Nach 8 Wochen *in vivo* konnten venöse und arterielle Gefäßstrukturen differenziert werden (s. Abb. 25 C,D).

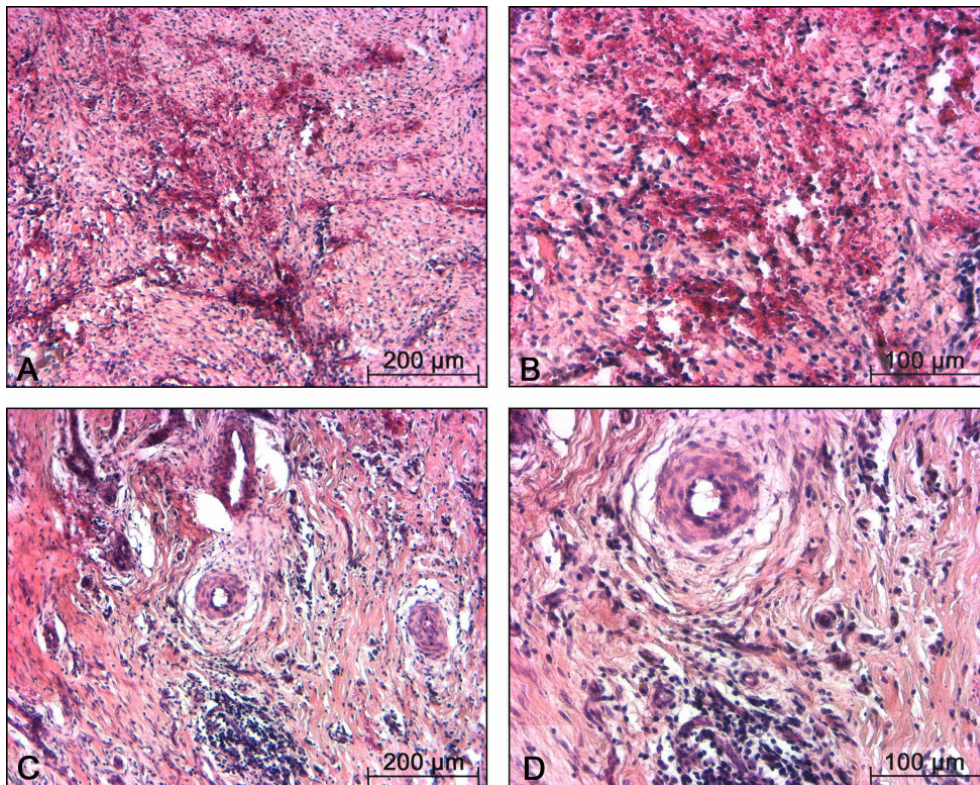


Abb. 25: Histologische Schnitte in HE-Färbung: **(A,B)** beginnende Vaskularisierung nach 4 Wochen *in vivo* **(C,D)** arterielle und venöse Gefäßstrukturen nach 8 Wochen *in vivo*

4.5.3 Beurteilung der extrazellulären Matrixbestandteile

Mit Hilfe der Movat-Pentachrome-Färbung gelang die Darstellung der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix. Diese besitzt bei einer nativen Klappe eine charakteristische Anordnung in vier Schichten. So kann man die schmale, aus kollagenen und elastischen Fasern bestehende Arterialis, die kollagenreiche Fibrosa, die proteoglykanreiche Spongiosa und die elastinreiche Ventrikularis unterscheiden (s. Abb. 26 A,B). Diese typische Schichtung war auch noch nach 4 Wochen *in vivo*, in der von Neointima umhüllten Tasche, deutlich zu erkennen (s. Abb. 26 C,D). Mit zunehmender Implantationsdauer erfolgte ein progredienter Strukturverlust, die typische Gliederung ging verloren und war nach 12 Wochen *in vivo* nicht mehr zu erkennen (s. Abb. 26 E-H). Die Neointima stellte sich als aus einem Gemisch von kollagenen Fasern und Proteoglykanen bestehendes Bindegewebe dar. Unregelmäßige Verläufe der von ihr umhüllten Strukturen wurden durch unterschiedliche Dicke der Neointima ausgeglichen, so dass zum Lumen hin eine gleichmäßige, glattverlaufende Oberfläche entstand (s. Abb. 26 G).

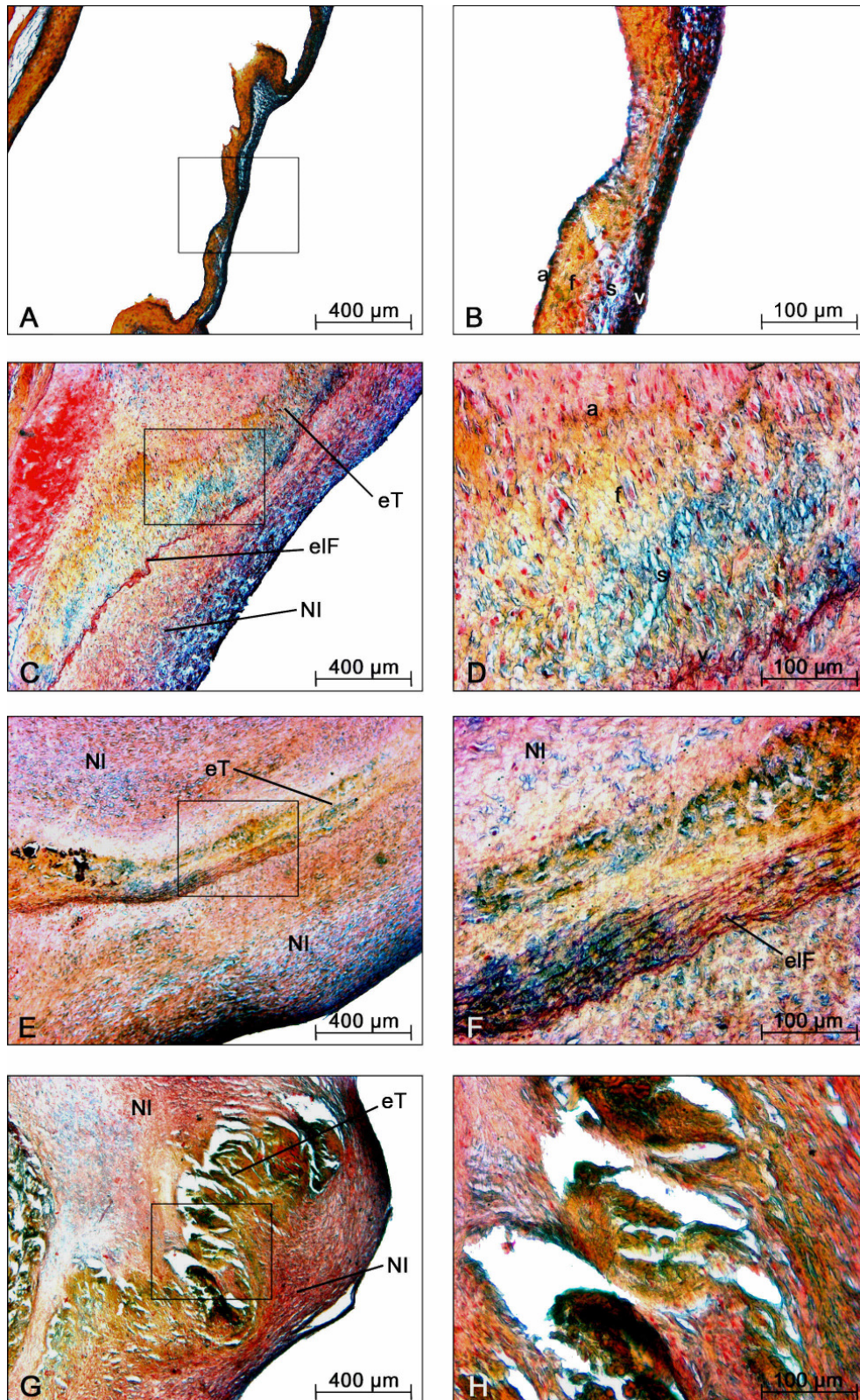


Abb. 26: Histologische Schnitte in Movat–Pentachrom-Färbung von: **(A,B)** native Schaf-Aortenklappe; mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelte Klappe: **(C,D)** nach 4 Wochen *in vivo*, **(E,F)** nach 8 Wochen *in vivo*, **(G,H)** nach 12 Wochen *in vivo*; (eT) ehemalige Tasche, (NI) Neointima, (a) Arterialis, (f) Fibrosa, (s) Spongiosa, (v) Ventrikularis, (elF) elastische Fasern

Bei den nur mit Endothelzellen besiedelten Herzklappen zeigte sich nach 12 Wochen ein ähnliches Bild. Die typische schichtweise Struktur war in der ehemaligen Tasche, die auch hier komplett von Neointima überzogen wurde, nicht mehr erkennbar (s. Abb. 27 A,B). Die früheren Taschen der nur mit Myofibroblasten besiedelten Klappen waren nur noch als ein schmaler Streifen erahnbar, der von Neointima und thrombotischen Material umhüllt wurde (s. Abb. 27 C,D).

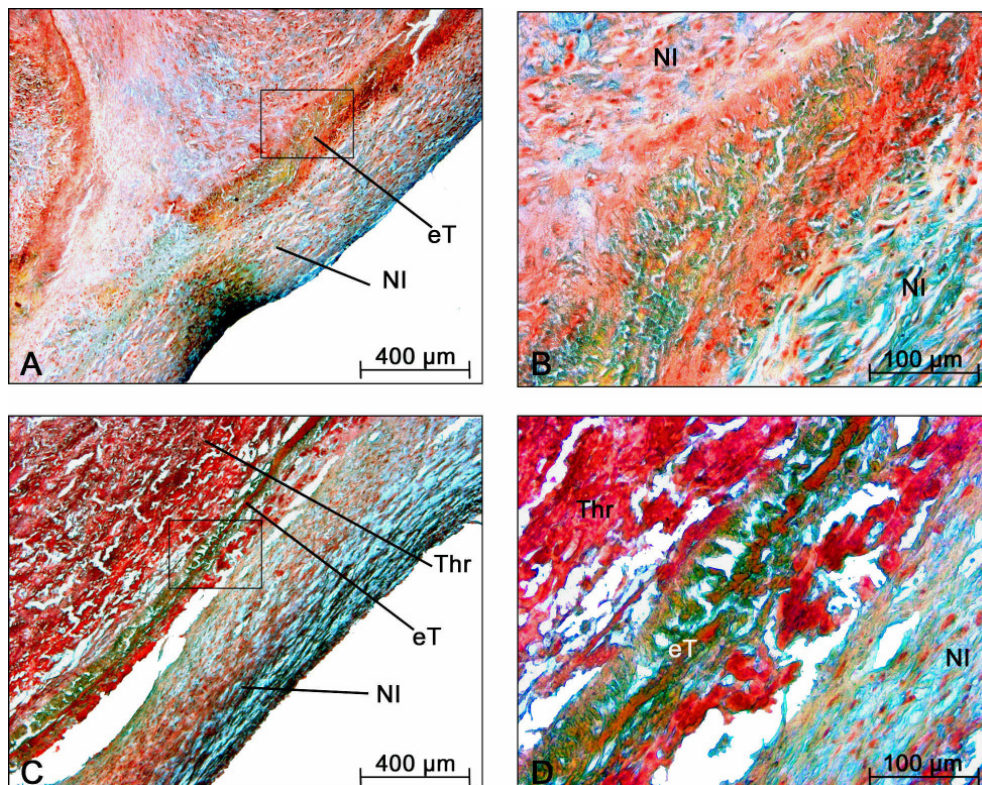


Abb. 27: Histologische Schnitte in Movat-Pentachrom-Färbung: **(A,B)** mit Endothelzellen besiedelte Herzklappe nach 12 Wochen *in vivo* **(C,D)** mit Myofibroblasten besiedelte Herzklappe nach 12 Wochen *in vivo*; (eT) ehemalige Tasche, (NI) Neointima, (Thr) Thrombusformation

Durch die Resorcin-Fuchsin-Färbung gelang eine selektivere Darstellung der elastischen Faserelemente in den Präparaten. Dabei waren Ansammlungen solcher Fasern, ähnlich wie bei einer nativen Klappe (s. Abb. 28 A,B), besonders im Bereich der Ventrikularis der ehemaligen Tasche anzutreffen. Nach 4 Wochen *in vivo* besaßen diese eine noch sehr kompakte Anordnung, die sich mit steigender Implantationsdauer zunehmend auflockerte (s. Abb. 28 C-H).

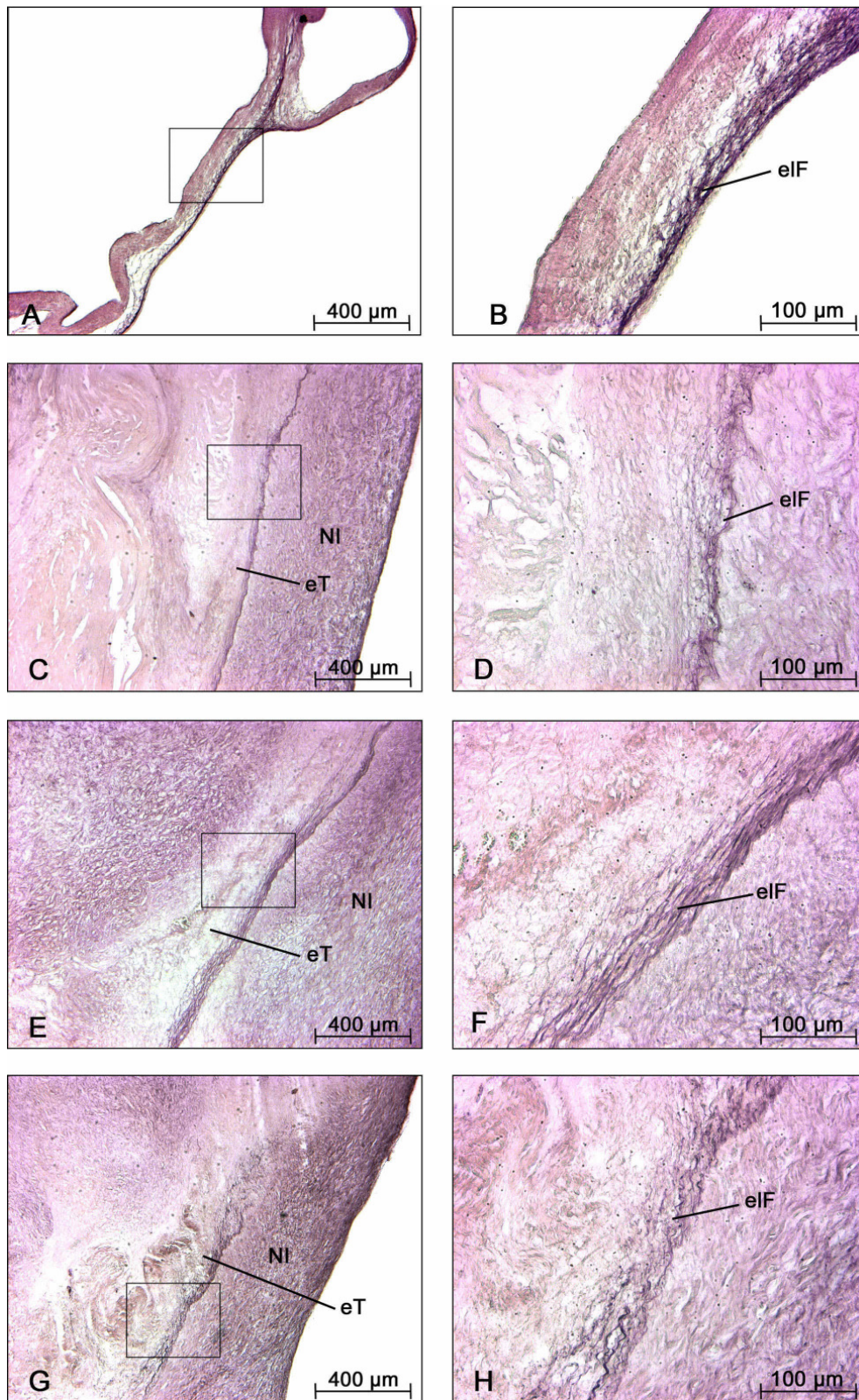


Abb. 28: Darstellung der elastischen Fasern mittels Resorcinfuchsinfärbung (**A,B**) native Aortenklappe vom Schaf; (**C,D**) TE-Klappe nach 4 Wochen *in vivo* (**E,F**) TE-Klappe nach 8 Wochen *in vivo*; (**G,H**) TE-Klappe nach 12 Wochen *in vivo*; (eT) ehemalige Tasche, (NI) Neointima, (a) Arterialis, (f) Fibrosa, (s) Spongiosa, (v) Ventrikularis, (eIF) elastische Fasern

Bei der Betrachtung der extrazellulären Matrixkomponenten im Gefäßsegment stellte sich ein schichtweiser Aufbau dar. So fand sich in den abluminalen peripheren Abschnitten eine Zone bestehend aus homogen strukturiertem Bindegewebe, ein sich daran anschließender Bereich aus bindegewebigem Material mit lose verteilten elastischen Fasern, der in eine breitere Zone mit dicht angeordneten elastischen Faserelementen überging. Die abschließende, in Richtung Lumen angrenzende Schicht, wurde durch die aus Bindegewebe mit überwiegend kollagenen Fasern und Proteoglykanen bestehenden Neointima gebildet (s. Abb. 29 A-D).

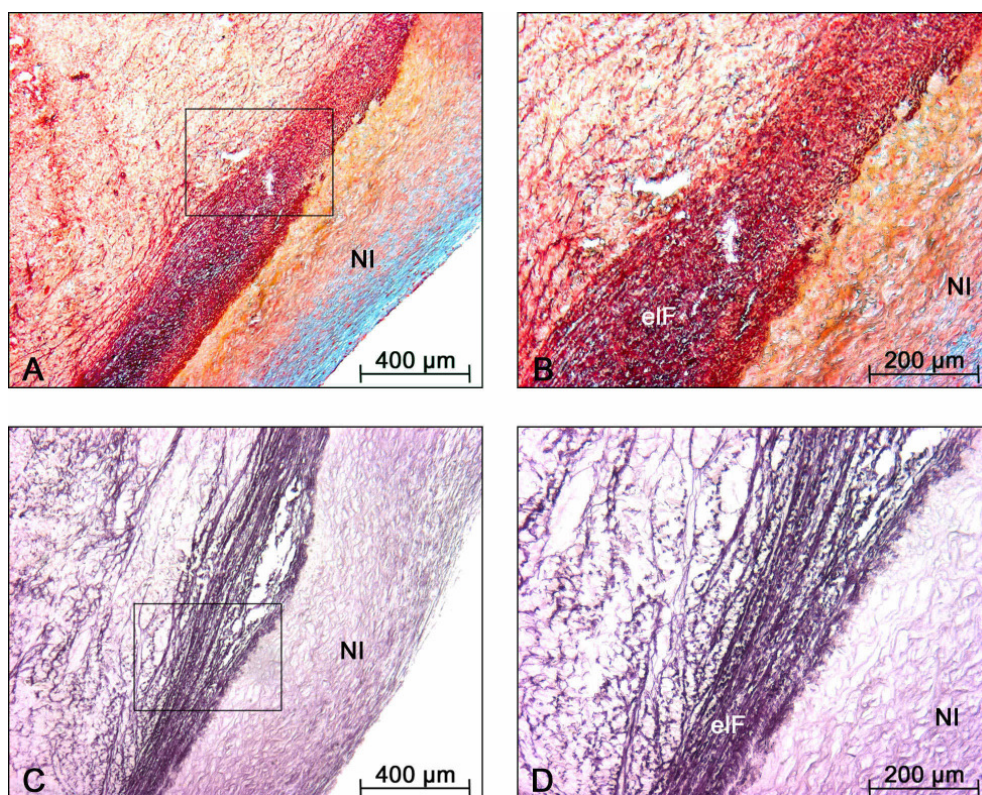


Abb. 29: Darstellung der extrazellulären Matrix des Gefäßsegmentes bei einer mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Klappe nach 4 Wochen *in vivo*; **(A,B)** Movatpentachromfärbung, **(C,D)** Resorcinfuchsinfärbung; (NI) Neointima, (elF) elastische Fasern

Ein Antikörperrnachweis von Kollagen 1 brachte ein positives Signal, das besonders stark im Bereich der ursprünglichen Klappe ausgeprägt war (s. Abb. 30 A). Beim Nachweis von Kollagen 3 kam es, wenn überhaupt, nur zu einem schwach positiven Signal (s. Abb. 30 B). Bei der nativen Vergleichsklappe brachte der Nachweis dieser beiden Matrixkomponenten innerhalb der Klappentasche ein ähnliches Ergebnis (s. Abb. 30 D,E).

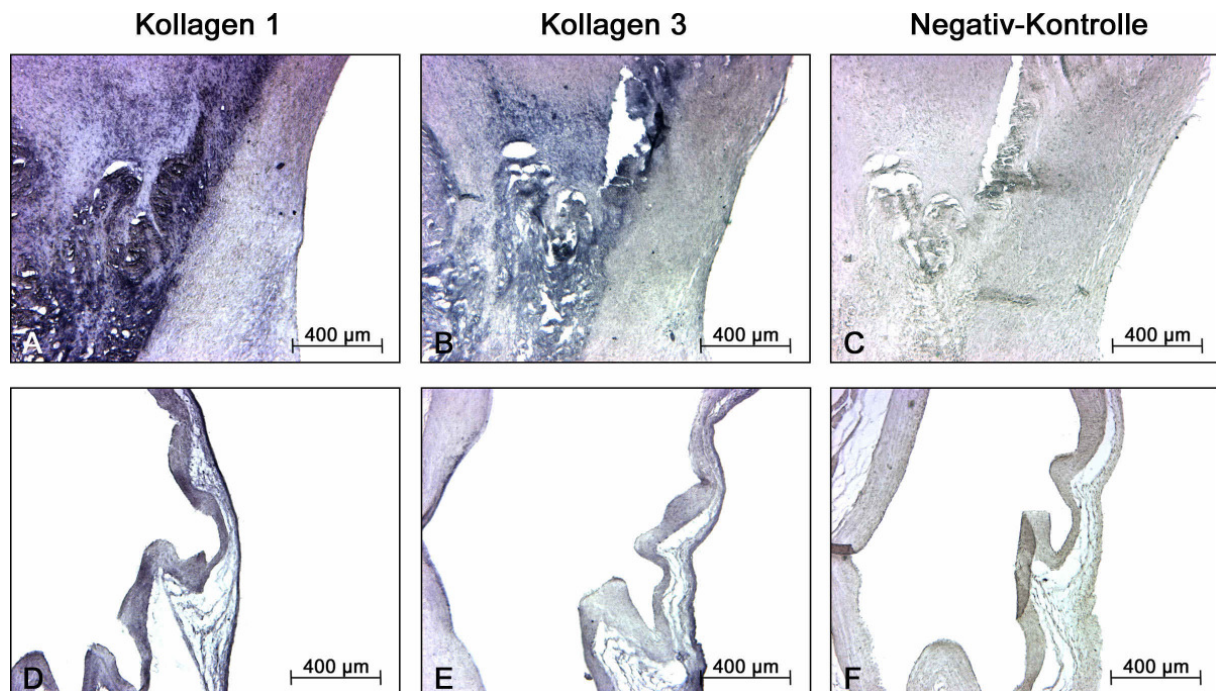


Abb. 30: Immunhistochemische Markierung von Kollagen 1 u. 3 bei einer (A-C) mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Klappe nach 12 Wochen *in vivo*, (D-F) Aortenklappe vom Schaf; (C,F) Negativ-Kontrollen, bei denen der erste Antikörper weggelassen wurde; (ein positives Signal ist durch Schwärzung im Bild zu erkennen)

4.5.4 Phänotypische Charakterisierung der zellulären Bestandteile

Hinsichtlich der vorkommenden Zellphänotypen konnten zwischen den unterschiedlichen Explantationszeitpunkten und unterschiedlichen Besiedlungstypen kaum signifikante Unterschiede festgestellt werden. Im gesamten Klappengewebe innerhalb des jeweiligen Präparates zeigte sich an den mit Zellen besiedelten Arealen ein stark positives Signal für glattmuskuläres Aktin (α -SMA) (s. Abb. 31 A-C) und Vimentin (s. Abb. 31 D-F). Der Nachweis von glattmuskulären Caldesmon fiel in allen Präparaten negativ aus (s. Abb. 31 G-I). Zellen mit einem positiven Signal für

den von Willebrand Faktor (vWF) waren fast ausschließlich an den luminalen Oberflächen der Klappen und innerhalb von Gefäßen, die in den peripheren Zonen der Präparate vorkamen, anzutreffen. Die mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Klappen zeigten dabei eine kontinuierlich verlaufende, die Oberfläche abgrenzende Schicht aus vWF positiven Zellen (s. Abb. 31 J-L). Die nur mit Endothelzellen besiedelten Klappen zeigten ein identisches Bild. Bei den nur mit Myofibroblasten besiedelten Präparaten verlief diese Zellschicht häufig sehr unregelmäßig mit teilweisen Unterbrechungen.

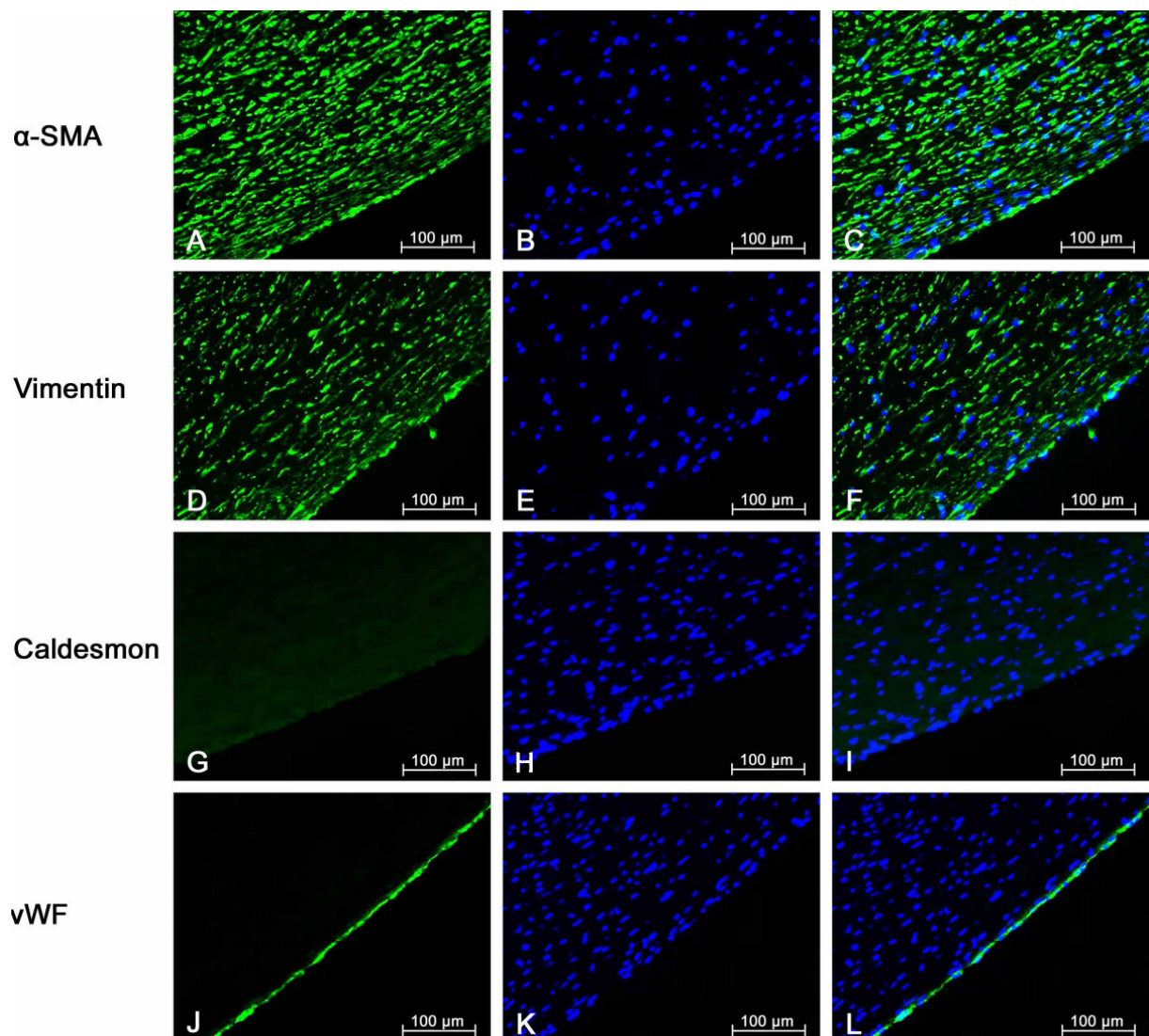


Abb. 31: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von immunhistochemisch markierten Zellen in mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Präparaten nach 12 Wochen *in vivo*; (A,D,G,J) der jeweilige mit FITC sichtbar gemachte Antikörper (grünes Signal), (B,E,H,K) Gegenfärbung der DNS mit DAPI (blaues Signal), (C,F,I,L) Fotomontage der jeweiligen FITC- und DAPI-Aufnahmen

Die nur oberflächliche Ansammlung von Zellen im Gefäßsegment der Klappen aus den vorzeitig verstorbenen Tieren, wie bereits unter Punkt 4.5.2 beschrieben, konnte im Fluoreszenzmikroskop bestätigt werden. In der Darstellung der Zellkerne durch mit DAPI markierter DNS war nur eine ein- bis zweischichtige, teilweise diskontinuierlich verlaufende Zellschicht an der luminalen Oberfläche zu erkennen (s. Abb. 32 C). Die Zellen zeigten fast ausschließlich ein positives Signal für den von Willebrand Faktor (s. Abb. 32 B). Nur ganz vereinzelt waren α -Aktin positive Zellen zu erkennen.

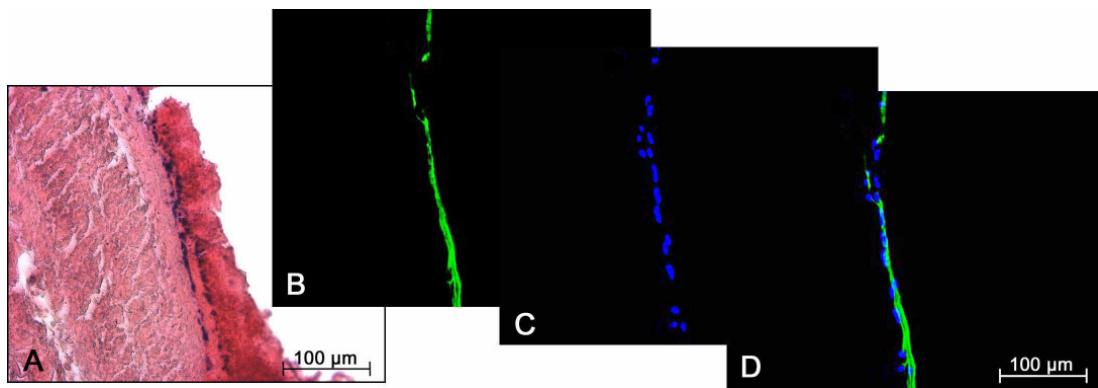


Abb. 32: Ausschnitt aus dem Gefäßsegment einer mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Klappe nach einer Stunde *in vivo*: **(A)** Darstellung in HE-Färbung, **(B)** Markierung mit von Willebrand Faktor (grün dargestellt), **(C)** Anfärbung der DNS mit DAPI (blau dargestellt) **(D)** Fotomontage von B und C

4.5.5 Darstellung von Verkalkungen innerhalb der Präparate

Mit Hilfe der von Kossa-Färbung kamen Verkalkungen im Klappengewebe an unterschiedlichen Stellen zur Darstellung. Am häufigsten waren solche Kalzifizierungen im Bereich der Taschenspitze (s. Abb. 33 A,D) und in der Nähe der proximalen Anastomosenregion, zwischen ehemaligem Herzmuskel und nativer Aorta, anzutreffen (s. Abb. 33 B, E). Am stärksten betroffen waren die nur mit Myofibroblasten besiedelten Präparate, die vor allem im Bereich der ursprünglichen Tasche besonders massive Ablagerungen aufwiesen (s. Abb. 33 C,F).

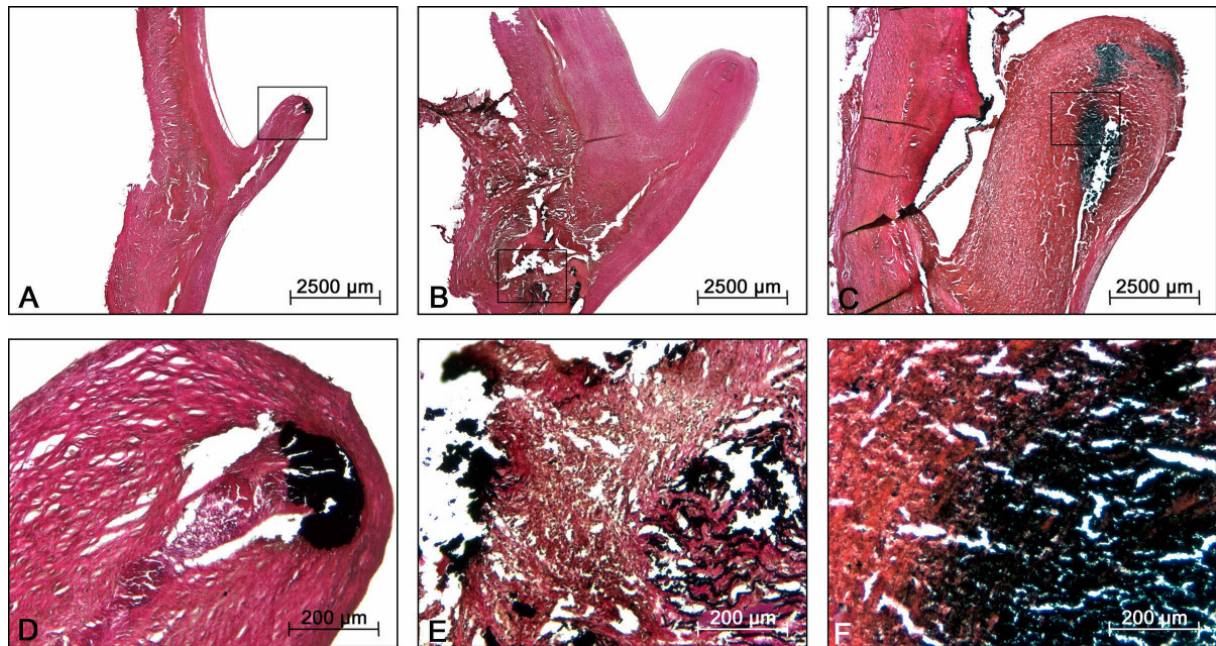


Abb. 33: Darstellungen von Kalkablagerungen durch von Kossa-Färbung: **(A,D)** nur mit Endothelzellen besiedelte Klappe nach 12 Wochen *in vivo*, **(B,E)** mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelte Klappe nach 8 Wochen *in vivo*, **(C,F)** nur mit Myofibroblasten besiedelte Klappe nach 12 Wochen *in vivo*; (Kalkablagerungen schwarz dargestellt)

5. Diskussion

Bisherige *in vivo* Versuche mit tissue engineerter Herzklappen im Großtiermodell beschränkten sich überwiegend auf den Einsatz im Niederdrucksystem (Dohmen et al. 2003, Leyh et al. 2003, Shinoka et al. 1995, Sodian et al. 2000, Steinhoff et al. 2000). Über *in vivo* Versuche, die auf den klinisch weitaus bedeutsameren Ersatz der Aortenklappe durch Verfahren des Tissue Engineerings ausgerichtet sind, ist in der Literatur zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur wenig bekannt. Schenke-Layland et al. beschrieben ein vielversprechendes Konzept zur *in vitro* Herstellung einer Aortenklappe (Schenke-Layland et al. 2003b). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Konzept erstmalig in der Systemzirkulation an einem Großtiermodell getestet.

5.1 Biomechanische Stabilität der Klappen

Beim Einsatz von tissue engineerter Herzklappen in der Hochdruckzirkulation werden aufgrund der erheblich höher wirkenden Druckkräfte besondere Anforderungen an ihre biomechanische Stabilität gestellt. Bislang liegen jedoch kaum Erfahrungen über die Performance solcher Konstrukte vor. Lediglich der Einsatz von tissue engineerter Gefäßen in der Hochdruckzirkulation ist beschrieben worden (Opitz et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnten die Implantationen bei allen Versuchstieren erfolgreich abgeschlossen werden. Die tissue engineerter Herzklappen hielten dabei arteriellen Mitteldrücken von durchschnittlich 110 mmHg stand. Intraoperativ traten systolische Druckspitzen von über 180 mmHg auf, die makroskopisch keine unmittelbaren Schädigungen an den Implantaten verursachten. Postoperativ kam es jedoch bei einem Versuchstier zu einem Einriss im Gefäßsegment der implantierten Klappe, was den Tod des Tieres zur Folge hatte. Als Ursache für dieses strukturelle Versagen wird eine ungenügende Rebesiedlung der Klappe angenommen. Im Gegensatz zur Klappentasche, bei der histologisch eine konfluente und gleichmäßige Besiedlung zu erkennen war, zeigte sich im Bereich der ehemaligen Pulmonalarterie nur eine oberflächliche Zellbesiedlung. An einem weiteren Versuchstier, welches durch pulmonales Versagen vorzeitig verstarb, konnte dieses Besiedlungsdefizit bestätigt werden. Die Gründe für die mangelnde Besiedlung des Gefäßsegmentes

mit autologen Zellen sind in einer technischen Limitation des Bioreaktors zu suchen. Der parallel zur Gefäßwand verlaufende Fluss des Zellkulturmediums trifft während des Klappenschlusses senkrecht auf die Taschenklappen und ermöglicht durch die Druckstimulation eine Migration der Zellen in die Tiefe des Gewebes. Im Bereich der Gefäßwand der Herzklappe wirken diese Kräfte jedoch aufgrund der parallel gerichteten Strömungsrichtung vor allem in Längsrichtung. Somit wird eher ein Abspülen der Zellen, als eine Migration in das Gewebe erreicht. In bisherigen Versuchen, in denen tissue engineerte Herzklappen durch dynamische *in vitro* Besiedlungsverfahren mit Bioreaktoren hergestellt wurden, konzentrierte man sich überwiegend auf die Charakterisierung der Klappentaschen (Cebotari et al. 2002, Hoerstrup et al. 2000b, Rabkin et al. 2002, Schenke-Layland et al. 2003b). Die Gefäßwand stand in diesen Arbeiten nicht im Fokus histologischer Untersuchungen. Da sie aber einen wesentlichen Teil des Implantats ausmacht, muss ihr in zukünftigen *in vitro* und *in vivo* Versuchen vermehrte Aufmerksamkeit geschenkt werden. Der akut aufgetretene Riss, der zwar nur bei einem von 10 Versuchstieren vorkam, macht deutlich, daß besonders in der Hochdruckzirkulation das Gefäßsegment eine potentielle Schwachstelle für den Erfolg von tissue engineered Herzklappen darstellen könnte.

5.2 *In vivo* Remodelling der Tissue Engineerten Herzklappen

Das *in vivo* stattfindende Remodelling stellt einen für den Erfolg einer tissue engineered Herzklappe elementaren Prozess dar. Ziel ist eine parallel zur Gewebeproduktion stattfindende schrittweise Degradation oder Metabolisierung des Grundgerüsts, so dass schließlich nur die neu gezüchtete Herzklappe ohne Startermatrix verbleibt (Vacanti et al. 1988). Die Produktion und Degradation extrazellulärer Bestandteile hat einen entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung der gezüchteten Herzklappen. Der physiologische Matrix-Turnover in Geweben wird u.a. durch eine Enzymfamilie, den Matrixmetalloproteinasen (MMPs), und deren physiologischen, endogenen Inhibitoren (TIMPs) gesteuert (Braunhut und Moses 1994, Moses und Shing 1994, Stock et al. 2001).

Bei der Charakterisierung der explantierten Präparate zeigte sich eine Reihe auffälliger Veränderungen. Die Taschen erschienen makroskopisch verdickt und

degeneriert. Im histologischen Bild waren residuale Klappenstrukturen in eine massive neointimale Umhüllung eingebettet. Die Taschen der nur mit Myofibroblasten besiedelten Klappen waren überwiegend von einer massiven, teilweise endothelialisierten Thrombusformation umgeben. Die Untersuchung der extrazellulären Matrix durch Movat's Pentachromfärbung und Resorcinfuchsinfärbung zeigte eine mit zunehmender Implantationsdauer fortschreitende Degenerierung der den ehemaligen Klappentaschen entsprechenden Bereiche. So war nach 4-wöchiger Implantation die typische Schichtengliederung einer Aortenklappe mit Arterialis, Fibrosa, Spongiosa und Ventrikularis (Schoen 1997) noch klar abgrenzbar. Das noch vital erscheinende Gewebe war gleichmäßig mit Zellen besiedelt. Mit zunehmender Implantationsdauer trat jedoch ein steigender Struktur- und Zellverlust auf. Nach 12 Wochen *in vivo* bestanden die Taschen aus nekrotischem avitalem Gewebe, welches durch neointimales Gewebe umhüllt war. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtungen könnte eine durch die neointimale Überwucherung bedingte Minderversorgung der im Inneren liegenden Klappenanteile darstellen. Die Zellen in diesem Bereich werden hypoxisch, gehen zugrunde und die typische Klappenstruktur wird aufgelöst, da keine neue extrazelluläre Matrix produziert werden kann.

Die zellulären Komponenten der Neointima bestanden aus einer oberflächlichen Endothelzellschicht, die sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie als eine einlagige, von Willebrand Faktor (vWF) positive Zellschicht darstellte. Die darunter liegenden Zellen zeigten neben einem positiven Signal für Vimentin auch ein positives Signal für α -Aktin. Die Darstellung von glattmuskulärem Caldesmon gelang nicht. Damit weisen die Zellen phänotypische Merkmale auf, die einem myofibroblastären Zelltyp entsprechen, wie er vor allem im Zusammenhang mit Wundheilungsprozessen angetroffen wird (Darby et al. 1990, Rice und Leinwand 2003, Lazard et al. 1993). Da eine Neointimabildung auch bei den ausschließlich mit Endothelzellen besiedelten Klappen beobachtet werden konnte, wird deutlich, dass für diese Prozesse nicht allein die *in vitro* aufgebrachten Zellen verantwortlich gemacht werden können, sondern auch eine Rekrutierung von Zellen aus der nativen Gewebeumgebung und aus dem Blut diskutiert werden muss (Shi et al. 1994).

In den abluminalen peripheren Bereichen der mit Myofibroblasten und Endothelzellen besiedelten Präparate kam es zu Umbauprozessen, bei denen ursprüngliches Klappengewebe durch fokal gruppierte lymphozytäre Infiltrationen abgebaut und

durch neugebildetes Bindegewebe ersetzt wurde. Das Ausmaß der lymphozytären Zellinfiltrationen korrelierte mit dem steigenden Auftreten von neueinsprossenden Kapillaren und kleinen Gefäßen. Dies lässt ein Einschwemmen von Entzündungszellen über diese neu entstandenen Vasa Vasorum vermuten. Auffällig ist, dass diese Reaktionen in den Bereichen des Implantats anzutreffen waren, in denen keine adäquate Rebesiedlung mit autologen Zellen erfolgte. So war vor allem das der ehemaligen Schweinepulmonalarterie entsprechende Gefäßsegment, in welchem bei den Präparaten der beiden vorzeitig verstorbenen Tiere nur eine oberflächliche Besiedlung mit Endothelzellen nachgewiesen werden konnte, von diesen Prozessen betroffen. Im Bereich der Klappentasche, die anfangs eine kontinuierliche Zellbesiedlung aufwies, waren solche Erscheinungen, zumindest nach 3 Monaten *in vivo*, noch nicht zu erkennen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen den beschriebenen Umbauprozessen und dem verstärkten Auftreten innerhalb ungenügend rebesiedelter Implantatsbereiche wird auch durch die Beobachtungen an den nur mit Endothelzellen besiedelten Klappen gestützt. Gerade hier scheint die Umorganisation des Gewebes *in vivo* besonders stark abzulaufen. So lassen sich in der HE-Darstellung besonders ausgeprägte Vernarbungszonen erkennen. Ob diese von außen nach innen ablaufenden Infiltrations- und Umbauprozesse Folge einer Fremdkörperreaktion auf die dezellularisierte Schweineklappenmatrix darstellen, wird derzeit kontrovers diskutiert und bedarf weiterer Untersuchungen (Stock und Schenke-Layland 2006). So beobachteten Rieder et al. *in vitro* eine signifikant niedrigere Migration menschlicher Monocyten innerhalb dezellularisierter humaner Pulmonalklappen verglichen mit dezellularisierten porcinen Pulmonalklappen (Rieder et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich das Remodelling der Klappen, nach den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, als ein von zwei Seiten ablaufender Prozess beschreiben. Von der luminalen Seite kommt es zur Bildung einer Neointima, die vermutlich zu einer Immobilisation der Klappentaschen führt. In den inneren Bereichen der Klappentaschen erfolgt eine progrediente Abnahme der Zellularität. Von der äußeren peripheren Seite des Implantats kommt es zur Einsprossung von Kapillaren, die sich im weiteren Verlauf zu kleinen Gefäßen weiterentwickeln und das Einwandern von Entzündungszellen ermöglichen. Das ursprüngliche Gewebe der ehemaligen Klappentasche wird abgebaut und durch neugebildetes Bindegewebe ersetzt, was sich im histologischen Bild in Form von Fibrosierungszonen darstellt.

5.3 Rolle des Endothels für Thrombenbildung und Verkalkung

Die meisten derzeit verwendeten Herzklappenprothesen besitzen keine funktionelle Endothelzellschicht. Dies erfordert bei mechanischen Herzklappen, zur Vermeidung thrombembolischer Ereignisse, die lebenslange medikamentöse Antikoagulation. Bei glutaraldehydfixierten Bioprothesen kommt es zur Ablagerung von Blutplättchen und Fibrin, sowie zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen und dem verstärkten Auftreten von Verkalkungen (Lehner et al. 1997, Frater et al. 1992). Im Bereich des Tissue Engineerings von kardiovaskulären Strukturen ist das Aufbringen von Endothelzellen, zur Verringerung der Thrombogenität und Verkalkungstendenz, ein fester Bestandteil vieler Besiedlungsstrategien (Bader et al. 1998, Dohmen et al. 2003, Hoerstrup et al. 2000b, Schenke-Layland et al. 2003b, Shinoka et al. 1995, Stock et al. 2000, Kasimir et al. 2005).

Auch in dieser Arbeit war ein Nutzen der *in vitro* endothelialisierten Implantate gegenüber den nicht endothelialisierten feststellbar. So waren die Taschen der nur mit Myofibroblasten besiedelten Präparate von einer massiven, teilweise endothelialisierten Thrombusformation umgeben. In der histologischen Darstellung der Klappen durch die von Kossafärbung zeigten sich massive Verkalkungen im Bereich der ehemaligen Tasche, die selbst nur noch als schmaler sklerotischer Streifen zu erkennen war. Bei den restlichen Präparaten, welche einer statischen *in vitro* Besiedlung mit Endothelzellen unterzogen wurden, zeigten sich nach einer Implantationsdauer ab einem Monat keine Anzeichen von thrombotischen Ereignissen. Verkalkungsherde waren nur im Anastomosenbereich und in der Spitze der Taschen zu erkennen. Das gehäufte Auftreten von Verkalkungen in der Taschenspitzenregion lässt sich möglicherweise auf Läsionen der Endothelbeschichtung zurückführen. Die im Bereich der Taschenspitze verstärkt auftretenden Scherkräfte könnten ein Abspülen von Endothelzellen, vor allem in der Frühphase, bewirken.

Generell muss diskutiert werden, ob zur Etablierung einer suffizienten Endothelzellschicht, die auch den mechanischen Belastungen innerhalb der Hochdruckzirkulation standhalten kann, die alleinige statische *in vitro* Besiedlung ausreichend ist. Diese Problematik wird auch durch die Beobachtungen an den Präparaten der beiden vorzeitig verstorbenen Tiere deutlich. Zwar konnte das Vorhandensein von Endothelzellen durch die Darstellung von vWF positiven Zellen in

der Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich teilweise eine subkonfluente Besiedlung. Auch makroskopisch waren Zeichen, die für eine insuffiziente Endothelschicht sprechen, zu erkennen. So war im gesamten Bereich des Implantates ein feiner Thrombensaum zu erkennen. Dieses Phänomen kann nicht allein darauf zurückgeführt werden, dass vor der Explantation aufgrund des unvorhergesehenen Todeseintritts keine Heparinabgabe erfolgen konnte. Da sich die angrenzenden distalen und proximalen nativen Aortenabschnitte völlig frei von thrombotischen Material darstellten, lässt sich zumindest eine herabgesetzte Antithrombogenität der luminalen Implantatsflächen annehmen. Die gemachten Beobachtungen lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass durch Manipulation der Herzklappe während der Implantation, sowie durch die hohen Fluss- und Druckkräfte in der Aorta, Endothelzellen, vor allem zum Zeitpunkt der Reperfusion, abgespült wurden und durch Dehnung des Implantates Mikroläsionen innerhalb der Endothelzellschicht entstehen, was zur Ablagerung von thrombotischem Material führt. Als weiteren Grund für die mangelnde Adhäsion bzw. funktionelle Insuffizienz der Endothelzellen werden von einigen Arbeitsgruppen auch die statischen Besiedlungsbedingungen gesehen. So kann das Fehlen einer physiologischen Belastung zu einer veränderten Genexpression und vermehrter Apoptose der Zellen führen (Kaiser et al. 1999). Außerdem wurde unter statischen Bedingungen die veränderte Synthese funktioneller Marker wie dem vWF und der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) beobachtet (Galbusera et al. 1997). Ein wesentlicher Ansatz zur Verbesserung der Adhäsionsquote der Endothelzellen könnte deshalb die Applikation von Scherkräften während der *in vitro* Besiedlung darstellen (Miyata et al. 1991). Auch eine adaptierte Exposition gegenüber den wirkenden Scherkräften scheint einen positiven Effekt auf die Integrität und Funktionalität der Endothelschicht zu haben. So machten Gulbins et al. die Beobachtung, dass artifiziell endothelialisierte porcine Schweineherzklappen und Gefäßprothesen aus Polyurethan verringerte Endothelläsionen und eine positive eNOS-Aktivität aufwiesen, wenn sie vor der maximalen Flussbelastung einer 30-minütigen Adaptationsphase mit geringeren Flusskräften unterzogen wurden (Gulbins et al. 2005). Sollten sich diese Beobachtungen *in vivo* bestätigen, würde sich dies auch auf unser Versuchsmodell übertragen lassen. So wäre die adaptierte Reperfusion der abgeklemmten Aorta eine technisch realisierbare Möglichkeit, um die Schädigung des Endothels zu verringern. Eine weitere Möglichkeit wäre die

Anwendung einer initialen medikamentösen Antikoagulation, so wie diese im klinischen Alltag bei der Verwendung von biologischen Klappenprothesen angewendet wird, um eine Endothelialisierung der nicht biologischen Klappenanteile abzuwarten. Eine solche Phase könnte dazu genutzt werden, eine *in vivo* Reparatur der Mikroläsionen innerhalb der Endothelzellschicht zu erreichen und somit das Auftreten von thrombotischen Prozessen und Verkalkungsherden zu verringern.

5.4 Bildung von Neointima

Die markanteste Veränderung der explantierten Klappen nach 1, 2 und 3 Monaten *in vivo* ist die massive Umhüllung der luminalen Klappenbereiche durch eine Neointima (bestehend aus kollagen- und proteoglykanreichen Bindegewebe), was zu einer Immobilisation der Klappentaschen geführt hat. Im klinischen Alltag ist die Bildung von neointimalen Gewebswucherungen ein bekanntes Problem. Die als Intimahyperplasie, neointimale oder auch myointimale Hyperplasie bezeichneten Prozesse werden für das Scheitern von Gefäßrekonstruktionen verantwortlich gemacht. So wird der Hyperplasie eine führende Rolle bei der Entstehung von Restenosen in Koronargefäßen nach PTCA (perkutane transluminale coronare Angioplastie) zugeschrieben (Yang und Moussa 2005). Bei der Rekonstruktion peripherer Gefäße wird ein großer Teil der Verschlüsse durch Neointimabildung verursacht (Mason et al. 1987, Echave et al. 1979). Auch die Restenose der Carotis nach Thrombendarteriektomie sowie die häufigen Stenosen an der venösen Anastomose bei alloplastischen Dialyseshuntis werden durch neointimale Hyperplasie hervorgerufen (Gelabert et al. 1994, Gagne et al. 2000, Kelly et al. 2002, Metz et al. 2002, Sanders et al. 1987). Ein Teil der Prozesse bei der chronischen Transplantatabstoßung ist nach Meinung einiger Forschergruppen mit der intimalen Hyperplasie vergleichbar (Newby und Zaltsman 2000, Waller et al. 2004). Physiologisch ist eine Intimahyperplasie beim Verschuß des Ductus Arteriosus Botalli nach der Geburt (Slomp et al. 1992) und während der Involution des Uterus zu beobachten (Newby und Zaltsman 2000).

Die Mechanismen der Neointimaentstehung sind sehr komplex und noch nicht völlig geklärt. Es existieren eine Reihe verschiedener Modelle. Schlüsselreize für die Entstehung einer Neointima stellen Verletzungen, Entzündungsreaktionen und

verstärkt wirkende Scherkräfte dar (Zwolak et al. 1987). Allgemein wird die Neointimabildung als Reaktion auf Traumata verstanden, bei der es durch Dedifferenzierung, Proliferation und Auswanderung von glatten Muskelzellen aus der Media zu einer verstärkten Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile kommt (Bauters et al. 1996). Die Entstehung der Neointima in den explantierten Präparaten dieser Studie ist durch diese Theorie jedoch nicht ausreichend erklärbar, da eine signifikante Neointimabildung auch in den ausschließlich mit Endothelzellen besiedelten Präparaten auftrat. In diesen waren jedoch anfangs keine matrixproduzierende Zellen vorhanden, so dass andere Herkunftsorte für die neointimabildenden Zellen diskutiert werden müssen. Ein möglicher Ursprungsort für die Neointimaentstehung ist die Anastomosenregion. Die Naht und das dadurch verursachte intramurale Trauma, stellen einen starken Proliferationsreiz für die glatten Muskelzellen im nativen Gefäßanteil dar, was zu einer Gewebshyperplasie in diesen Bereichen führen kann (Ballyk et al. 1998). Ob aber allein daraus eine gleichmäßige Inkorporation der kompletten Klappe mit Neointima entstehen kann, ist fraglich.

Einen interessanten Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen liefert eine Theorie von Schwartz et al., in der die Neointimaentstehung in drei Phasen eingeteilt wird (Schwartz et al. 1992). Die erste, frühauftretende „thrombotische“ Phase ist durch Ablagerung von Thrombozyten, Fibrin und roten Blutkörperchen gekennzeichnet. Anschließend kommt es zu einer Endothelialisierung der Thrombusformation und einer Infiltration des gebildeten Netzwerkes durch matrixproduzierende Zellen und Monocyten aus dem Blutstrom. In der dritten Phase bildet sich eine zunehmend dicker werdende luminale Schicht mit aktinpositiven Zellen. Die Beobachtungen bei den Klappen der beiden vorzeitig verstorbenen Tiere könnten gut der ersten Phase dieser Theorie zugeordnet werden. Läsionen innerhalb der Endothelschicht führten zur Ablagerung thrombotischen Materials, auf dessen Grundlage sich im weiteren Verlauf eine Neointima entwickelt. Außerdem ließe sich damit ggf. erklären, warum es auch bei den ausschließlich mit Endothelzellen besiedelten Präparaten zu einer Intimahyperplasie gekommen ist.

Bei den Prozessen der Neointimaentstehung scheint vor allem das Endothel eine entscheidende Rolle zu spielen (Fingerle et al. 1990, Darcin et al. 2001). Deshalb ist ein wesentlicher Ansatz zur Verhinderung von Intimahyperplasie die Anwendung von „Endothelial Cell Seeding“ (ECS), wodurch verbesserte Offenheitsraten von

Gefäßprothesen erreicht werden konnten (Herring et al. 1984, Stanley et al. 1982, Darcin et al. 2001). Somit ist das Endothel im Bereich des Tissue Engineerings kardiovaskulärer Strukturen nicht nur für die Verhinderung thrombotischer Prozesse und Verkalkungen von Bedeutung. Die Etablierung einer suffizienten Endothelschicht, wie unter 5.3 diskutiert, könnte auch zu einer Verhinderung der Neointimaentstehung beitragen und die Immobilisation der Klappentaschen verhindern.

Weitere wichtige, die Intimahyperplasie beeinflussende Faktoren, stellen physikalische Signale wie Druck und Wandspannung dar (Zwolak et al. 1987, Weiser et al. 1995). Bei der Verwendung von Venengrafts innerhalb der arteriellen Zirkulation wird eine verstärkte Synthese vom Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) beobachtet, welcher einen Einfluss auf die Regulation der Proliferation glatter Muskelzellen zu haben scheint (Francis et al. 1994). Durch externe Stents bei Venengrafts konnte im Schweinemodell eine Verringerung der Neointimabildung und eine reduzierte Expression von PDGF erzielt werden (Mehta et al. 1998, Vijayan et al. 2004). Der Einsatz eines externen Stents wäre auch bei tissue engineerter Herzklappen denkbar. Dadurch könnten möglicherweise die wirkenden Spannungskräfte in der Implantatswand verringert und die Intimahyperplasie positiv beeinflusst werden.

Der Grund, warum das Phänomen der Neointimabildung auf dem Gebiet des Tissue Engineerings von Herzklappen bisher keine wesentliche Betrachtung fand, könnte darin gesucht werden, dass sich bisherige *in vivo* Versuche auf den Einsatz innerhalb der Niederdruckzirkulation beschränkten. Möglicherweise laufen hier die Prozesse der Neointimaentstehung bei weitem nicht so ausgeprägt ab, da wichtige Schlüsselfaktoren wie Druck und Wandspannung viel geringer wirken, als in der Hochdruckzirkulation.

5.6 Diskussion des gewählten Tiermodells

Nach anfänglicher Verwendung von Hunden als Versuchstiere auf dem Gebiet der Herzklappenchirurgie, setzte sich neben der Verwendung von Kälbern, Schweinen und Nagern, das Schaf als Tiermodell der Wahl durch (Ali et al. 1996). Schafe sind leicht zu handhaben, und die Wachstumsdynamik von Herz und großen Gefäßen

entspricht weitgehend der des Menschen (Stock et al. 2002). Vor allem in jungen Schafen sind Kalzifizierungsprozesse besonders ausgeprägt, wodurch Verkalkungstendenzen, die beim Menschen erst nach Jahren auftreten, beim Schaf schon nach kurzer Implantationszeit nachgewiesen werden können (Barnhart et al. 1982, Goldstein et al. 2000). In jüngster Zeit wird jedoch zunehmend bezweifelt, ob das Schaf ein für den Menschen geeignetes präklinisches Tiermodell darstellt. So scheint sich im Verlauf der letzten Jahre herauszukristallisieren, dass Klappenimplantationen im Schafmodell eine überschießende Fibrosierungsantwort hervorrufen, so dass die Klappen stärker von fibrotischem Gewebe überwachsen werden, als dies im Mensch der Fall wäre (Vesely 2005). Sollte sich diese These weiterhin bestätigen, könnte der massive Überwuchs mit Neointima, wie es in dieser Arbeit schon nach einem Monat *in vivo* zu erkennen war, als besondere speziesabhängige Reaktion gewertet werden. Bei der Verwendung anderer Versuchstiere, z.B. Schwein, wären diese Erscheinungen möglicherweise nicht so ausgeprägt anzutreffen. Deswegen müssen Versuche auch an alternativen Tiermodellen in Erwägung gezogen werden, um eine Fehleinschätzung über die Eignung von tissue engineered Konstrukten für den Menschen zu vermeiden.

Die in dieser Arbeit verwendete heterotope Implantationsmethode innerhalb der Aorta descendens orientierte sich an einem von Hilbert et al. etablierten Versuchsmodell zur Untersuchung cryokonservierter Allografts (Hilbert et al. 1999). Ein wesentlicher Vorteil der Methode ist, dass die Durchführung ohne Verwendung einer Herz-Lungenmaschine erfolgen kann. Die Eingriffe waren nach etwa 3 Stunden beendet und wurden von allen Tieren überlebt. Die intraoperative Todesrate lag damit deutlich unter dem Schnitt vergleichbarer Studien, bei denen Herzklappen in die Hochdruckzirkulation eingesetzt worden sind (Gott et al. 1997, Ali et al. 1996). Ein Problem der heterotopen Implantation stellt jedoch die Simulation des diastolischen Klappenschlusses dar. Dies wurde durch die Anlage eines proximal der Klappe gelegenen aorto-kardialen Shunts erreicht. Ein Öffnen und Schließen der Klappentaschen konnte jedoch nur zum Zeitpunkt der Implantation registriert werden. In einer präexplantatorisch durchgeführten Ultraschalluntersuchung ließ sich eine Bewegung der Taschen trotz durchgängiger Shunts nicht mehr nachweisen. Ob diese Beobachtungen ausschließlich auf die massive Neointimabildung zurückzuführen ist oder dabei auch Veränderungen im Shuntsystem eine Rolle spielen, muss in weiteren *in vivo* Versuchen, z.B. durch die Anwendung intravasaler Fluss- und

Druckmessungen, genauer untersucht werden. So wäre vorstellbar, dass neointimale Ablagerungen im Shuntbereich zu hämodynamisch relevanten Veränderungen führen bzw. die Effekte des Shunts auf die Druckverhältnisse durch kardiale Adaptationsmechanismen kompensiert werden.

Das hier verwendete Versuchsmodell stellt zwar eine relativ einfache Möglichkeit dar, die Auswirkungen der Hochdruckzirkulation auf tissue engineerter Herzklappen zu untersuchen, für den langfristig geplanten klinischen Einsatz sind jedoch *in vivo* Untersuchungen in orthotoper Klappenposition unabdingbar, da sich die Umgebungsverhältnisse einer Aortenklappe nur an dieser Stelle exakt reproduzieren lassen. Interessante Ansätze für eine unkomplizierte Durchführung eines solchen orthotopen Klappeneinsatzes bieten minimalinvasive, perkutane Implantationsmethoden, die sich derzeit in der Erprobung befinden (Lutter et al. 2002, Boudjemline et al. 2002, Laborde et al. 2005, Eltchaninoff et al. 2003, Ferrari et al. 2004). Dabei wird die Herzklappe in einen Stent integriert und durch eine perkutane, transluminale Kathetertechnik an den Ort der Implantation gebracht. Auch bei dieser Methode kann auf eine extrakorporale Zirkulation verzichtet werden. Die Etablierung dieser minimalinvasiven Implantationstechnik für den Einsatz tissue engineerter Aortenklappen, könnte eine zügigere Versuchsdurchführung ermöglichen. Dadurch ließen sich *in vivo* Versuche mit höheren Fallzahlen realisieren, was die statistische Aussagekraft der Studien verbessern würde.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Vor allem die Ergebnisse für die Präparate nach einem Monat *in vivo*, bei der die herzkklappentypische Struktur der Klappentasche noch gut erhalten ist und vitale Zellen im Klappenstroma zu erkennen sind, stimmen für die Zukunft optimistisch, falls es gelingt, die Bildung von Neointima zu verhindern. Das Phänomen der Intimahyperplasie bei tissue engineerter Herzklappen scheint ein besonderes Problem beim Einsatz in der Hochdruckzirkulation darzustellen. Die dabei ablaufenden Prozesse sind noch nicht genau verstanden und bedürfen weiterer Klärung. Da eine ausgeprägte Neointimabildung schon nach einem Monat *in vivo* aufgetreten war, sollten nachfolgende *in vivo* Versuche vorerst für einen Zeitraum bis maximal einem Monat angesetzt werden, um vor allem die ablaufenden Prozesse in der Frühphase zu erfassen. Durch die Etablierung von Zellmarkierungsverfahren ließen sich Aussagen treffen, welchen Beitrag die *in vitro* aufgebrachten Zellen für diese Phänomene leisten. Weiterhin muss geklärt werden, ob die massive Ausprägung dieser Intimahyperplasie eine schafspezifische Reaktion darstellt, oder auch bei anderen Tiermodellen in dieser schweren Form auftritt.

Der Verzicht auf Endothelzellbesiedlung führte in dieser Arbeit zu massiver Thrombenbildung und Verkalkung im Bereich der Klappentaschen. Durch eine statische Besiedlung mit Endothelzellen konnten diesbezüglich deutliche Verbesserungen erzielt werden. Die Intaktheit der *in vitro* aufgebrachten Endothelschicht scheint jedoch in der Frühphase eingeschränkt zu sein, was sich durch die Ablagerung von thrombotischem Material bemerkbar machte. Die Etablierung einer suffizienten Endothelzellschicht ist nicht nur zur Verhinderung von Thrombenbildung und Verkalkung von Bedeutung, auch für die Neointimabildung scheint ihr eine entscheidende Rolle zuzukommen. In zukünftigen Versuchen sollte auch für die Besiedlung mit Endothelzellen die Verwendung dynamischer *in vitro* Verfahren angestrebt werden, um die Zellen durch Applikation von Scherkräften an die Bedingungen in der Hochdruckzirkulation zu gewöhnen. Die Verwendung eines externen Stents könnte durch die Verhinderung einer zu starken Wanddehnung zu einer Reduktion der Endothelschäden und vermehrten Stabilität, vor allem im Bereich des Gefäßsegmentes, führen. Auch die Anwendung einer adaptierten Reperfusion bei der Implantation könnte möglicherweise zu einer Verringerung der Endothelläsionen beitragen. Eine Strategie, um die Auswirkungen dieser Läsionen zu

vermindern, wäre die Durchführung einer initialen medikamentösen Antikoagulationstherapie.

Für den klinischen Einsatz ist die Erschließung neuer Zellquellen von Bedeutung. Beim Menschen zugängliche Arterien sind nur im begrenzten Ausmaß vorhanden. Interessante Ansätze bietet die Verwendung embryonaler oder adulter Stammzellen, sowie Nabelschnurzellen (Pittenger et al. 1999, Shi et al. 1998, Chapekar 2000, Rezai et al. 2004).

Die Entwicklung minimalinvasiver Implantationsverfahren könnte in zukünftigen *in vivo* Versuchen eine elegante Methode darstellen, um tissue engineerte Herzklappen auf einfache Weise auch in orthotoper Position zu implantieren.

Grundsätzlich sollten auch frustrane Versuche, in angemessener Form publiziert werden und nicht nur vielversprechende Kurzzeitstudien. So sind in der Literatur keine histologischen Aufnahmen von gescheiterten Herzklappen zu finden, und so lässt sich nur wenig aus den negativen Erfahrungen anderer Forschergruppen lernen (Vesely 2005).

7. Literaturverzeichnis

- Ali ML, Kumar SP, Bjornstad K, Duran CM. 1996. The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovasc Surg*, 4 (4):543-549.
- al-Khaja N, Belboul A, Rashid M, el-Gatit A, Roberts D, Larsson S, William-Olsson G. 1991. The influence of age on the durability of Carpentier-Edwards biological valves. Thirteen years follow-up. *Eur J Cardiothorac Surg*, 5 (12):635-640.
- Bachetti T, Morbidelli L. 2000. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res*, 42 (1):9-19.
- Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, Haverich A. 1998. Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*, 14 (3):279-284.
- Badylak SF, Record R, Lindberg K, Hodde J, Park K. 1998. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed*, 9 (8):863-878.
- Ballyk PD, Walsh C, Butany J, Ojha M. 1998. Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. *J Biomech*, 31 (3):229-237.
- Barnhart GR, Jones M, Ishihara T, Chavez AM, Rose DM, Ferrans VJ. 1982. Failure of porcine aortic and bovine pericardial prosthetic valves: an experimental investigation in young sheep. *Circulation*, 66 (2 Pt 2):1150-1153.
- Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE, Pandit A. 2003. Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Ann Biomed Eng*, 31 (9):1017-1030.

- Bauters C, Meurice T, Hamon M, McFadden E, Lablanche JM, Bertrand ME. 1996. Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice. *Cardiovasc Res*, 31 (6):835-846.
- Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. 2002. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis*, 11 (4):457-462.
- Boudjemline Y, Bonnet D, Sidi D, Bonhoeffer P. 2002. Percutaneous implantation of a biological valve in the aorta to treat aortic valve insufficiency -- a sheep study. *Med Sci Monit*, 8 (4):BR113-116.
- Braunhut SJ, Moses MA. 1994. Retinoids modulate endothelial cell production of matrix-degrading proteases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). *J Biol Chem*, 269 (18):13472-13479.
- Butany J, Ahluwalia MS, Munroe C, Fayet C, Ahn C, Blit P, Kepron C, Cusimano RJ, Leask RL. 2003a. Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation. *Cardiovasc Pathol*, 12 (1):1-22.
- Butany J, Fayet C, Ahluwalia MS, Blit P, Ahn C, Munroe C, Israel N, Cusimano RJ, Leask RL. 2003b. Biological replacement heart valves. Identification and evaluation. *Cardiovasc Pathol*, 12 (3):119-139.
- Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A, Kleczka C, Ciubotaru A, Haverich A. 2002. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation*, 106 (12 Suppl 1):I63-I68.
- Chapekar MS. 2000. Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res*, 53 (6):617-620.

- Cole WG, Chan D, Hickey AJ, Wilcken DE. 1984. Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves. *Biochem J*, 219 (2):451-460.
- Cooper T, Napolitano LM, Fitzgerald MJ, Moore KE, Daggett WM, Willman VL, Sonnenblick EH, Hanlon CR. 1966. Structural basis of cardiac valvar function. *Arch Surg*, 93 (5):767-771.
- Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. 1994. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res*, 28 (6):655-666.
- Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. 1999. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther*, 79 (3):308-319.
- Curcio CA, Commerford PJ, Rose AG, Stevens JE, Barnard MS. 1981. Calcification of glutaraldehyde-preserved porcine xenografts in young patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 81 (4):621-625.
- Darby I, Skalli O, Gabbiani G. 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest*, 63 (1):21-29.
- Darcin OT, Islamoglu F, Yagdi T, Boga M, Doymaz MZ, Gezen MR. 2001. Effectiveness of endothelial cell seeding on patency of damaged vascular surfaces in a canine model. *Ann Vasc Surg*, 15 (3):350-354.
- Dohmen PM, Ozaki S, Nitsch R, Yperman J, Flameng W, Konertz W. 2003. A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model. *Med Sci Monit*, 9 (4):BR97-BR104.
- Dumont K, Yperman J, Verbeken E, Segers P, Meuris B, Vandenberghe S, Flameng W, Verdonck PR. 2002. Design of a new pulsatile bioreactor for tissue engineered aortic heart valve formation. *Artif Organs*, 26 (8):710-714.

- Echave V, Koornick AR, Haimov M, Jacobson JH, 2nd. 1979. Intimal hyperplasia as a complication of the use of the polytetrafluoroethylene graft for femoral-popliteal bypass. *Surgery*, 86 (6):791-798.
- Eltchaninoff H, Tron C, Cribier A. 2003. Percutaneous implantation of aortic valve prosthesis in patients with calcific aortic stenosis: technical aspects. *J Interv Cardiol*, 16 (6):515-521.
- Ferrari M, Figulla HR, Schlosser M, Tenner I, Frerichs I, Damm C, Guyenot V, Werner GS, Hellige G. 2004. Transarterial aortic valve replacement with a self expanding stent in pigs. *Heart*, 90 (11):1326-1331.
- Filip DA, Radu A, Simionescu M. 1986. Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells. *Circ Res*, 59 (3):310-320.
- Fingerle J, Au YP, Clowes AW, Reidy MA. 1990. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis*, 10 (6):1082-1087.
- Francis SE, Hunter S, Holt CM, Gadsdon PA, Rogers S, Duff GW, Newby AC, Angelini GD. 1994. Release of platelet-derived growth factor activity from pig venous arterial grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 108 (3):540-548.
- Frater RW, Gong G, Hoffman D, Liao K. 1992. Endothelial covering of biological artificial heart valves. *Ann Thorac Surg*, 53 (3):371-372.
- Gagne PJ, Martinez J, DeMassi R, Gregory R, Parent FN, Gayle R, Meier GH, 3rd, Philput C. 2000. The effect of a venous anastomosis Tyrell vein collar on the primary patency of arteriovenous grafts in patients undergoing hemodialysis. *J Vasc Surg*, 32 (6):1149-1154.
- Galbusera M, Zoja C, Donadelli R, Paris S, Morigi M, Benigni A, Figliuzzi M, Remuzzi G, Remuzzi A. 1997. Fluid shear stress modulates von Willebrand factor release from human vascular endothelium. *Blood*, 90 (4):1558-1564.

- Gelabert HA, el-Massry S, Moore WS. 1994. Carotid endarterectomy with primary closure does not adversely affect the rate of recurrent stenosis. *Arch Surg*, 129 (6):648-654.
- Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF. 2000. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *Ann Thorac Surg*, 70 (6):1962-1969.
- Gott JP, Girardot MN, Girardot JM, Hall JD, Whitlark JD, Horsley WS, Dorsey LM, Levy RJ, Chen W, Schoen FJ, Guyton RA. 1997. Refinement of the alpha aminooleic acid bioprosthetic valve anticalcification technique. *Ann Thorac Surg*, 64 (1):50-58.
- Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. 2003. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126 (6):2003-2010.
- Guarda E, Myers PR, Brilla CG, Tyagi SC, Weber KT. 1993. Endothelial cell induced modulation of cardiac fibroblast collagen metabolism. *Cardiovasc Res*, 27 (6):1004-1008.
- Gulbins H, Pritisanac A, Petzold R, Goldmund A, Doser M, Dauner M, Meiser B, Reichart B, Daebritz S. 2005. A low-flow adaptation phase improves shear-stress resistance of artificially seeded endothelial cells. *Thorac Cardiovasc Surg*, 53 (2):96-102.
- Hein S, Sohling B, Gottschalk G, Steinbuchel A. 1997. Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 153 (2):411-418.

- Herring M, Baughman S, Glover J, Kesler K, Jesseph J, Campbell J, Dilley R, Evan A, Gardner A. 1984. Endothelial seeding of Dacron and polytetrafluoroethylene grafts: the cellular events of healing. *Surgery*, 96 (4):745-755.
- Hilbert SL, Luna RE, Zhang J, Wang Y, Hopkins RA, Yu ZX, Ferrans VJ. 1999. Allograft heart valves: the role of apoptosis-mediated cell loss. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 117 (3):454-462.
- Hill AD, Folan-Curran J. 1993. Microappendages on the atrioventricular valves of the guinea pig. *J Anat*, 182 (Pt 3):425-428.
- Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. 2000a. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. *Tissue Eng*, 6 (1):75-79.
- Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, Sodian R, Visjager JF, Kolb SA, Grunenfelder J, Zund G, Turina MI. 2002. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation*, 106 (12 Suppl 1):I143-150.
- Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer JE, Jr. 2000b. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation*, 102 (19 Suppl 3):III44-49.
- Hollinger JO. 1983. Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA). *J Biomed Mater Res*, 17 (1):71-82.
- Hufnagel CA, Harvey WP, Rabil PJ, Mc DT. 1954. Surgical correction of aortic insufficiency. *Surgery*, 35 (5):673-683.

- Hurle JM, Colvee E, Fernandez-Teran MA. 1985. The surface anatomy of the human aortic valve as revealed by scanning electron microscopy. *Anat Embryol (Berl)*, 172 (1):61-67.
- Hutmacher D, Hurzeler MB, Schliephake H. 1996. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11 (5):667-678.
- Jockenhoevel S, Chalabi K, Sachweh JS, Groesdonk HV, Demircan L, Grossmann M, Zund G, Messmer BJ. 2001. Tissue engineering: complete autologous valve conduit--a new moulding technique. *Thorac Cardiovasc Surg*, 49 (5):287-290.
- Kadner A, Hoerstrup SP, Tracy J, Breymann C, Maurus CF, Melnitchouk S, Kadner G, Zund G, Turina M. 2002. Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Ann Thorac Surg*, 74 (4):S1422-1428.
- Kaiser D, Freyberg MA, Schrimpf G, Friedl P. 1999. Apoptosis induced by lack of hemodynamic forces is a general endothelial feature even occurring in immortalized cell lines. *Endothelium*, 6 (4):325-334.
- Kalmar P, Irrgang E. 2004. Cardiac surgery in Germany during 2003: a report by the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 52 (5):312-317.
- Kaltenbach M. 2000 *Kardiologie kompakt*. Darmstadt: Steinkopff Verlag GmbH & Co.KG, 220
- Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, Simon P. 2003. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*, 26 (5):421-427.

- Kasimir MT, Weigel G, Sharma J, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Simon P. 2005. The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation. *Thromb Haemost*, 94 (3):562-567.
- Kelly BS, Heffelfinger SC, Whiting JF, Miller MA, Reaves A, Armstrong J, Narayana A, Roy-Chaudhury P. 2002. Aggressive venous neointimal hyperplasia in a pig model of arteriovenous graft stenosis. *Kidney Int*, 62 (6):2272-2280.
- Kunzelman KS, Cochran RP, Murphree SS, Ring WS, Verrier ED, Eberhart RC. 1993. Differential collagen distribution in the mitral valve and its influence on biomechanical behaviour. *J Heart Valve Dis*, 2 (2):236-244.
- Laborde JC, Borenstein N, Behr L, Farah B, Fajadet J. 2005. Percutaneous implantation of an aortic valve prosthesis. *Catheter Cardiovasc Interv*, 65 (2):171-174; discussion 175.
- Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Koteliansky VE. 1993. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (3):999-1003.
- Lehner G, Fischlein T, Baretton G, Murphy JG, Reichart B. 1997. Endothelialized biological heart valve prostheses in the non-human primate model. *Eur J Cardiothorac Surg*, 11 (3):498-504.
- Leyh RG, Wilhelmi M, Rebe P, Fischer S, Kofidis T, Haverich A, Mertsching H. 2003. In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg*, 75 (5):1457-1463; discussion 1463.
- Lutter G, Kuklinski D, Berg G, Von Samson P, Martin J, Handke M, Uhrmeister P, Beyersdorf F. 2002. Percutaneous aortic valve replacement: an experimental study. I. Studies on implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 123 (4):768-776.

- Maish MS, Hoffman-Kim D, Krueger PM, Souza JM, Harper JJ, 3rd, Hopkins RA. 2003. Tricuspid valve biopsy: a potential source of cardiac myofibroblast cells for tissue-engineered cardiac valves. *J Heart Valve Dis*, 12 (2):264-269.
- Manduteanu I, Popov D, Radu A, Simionescu M. 1988. Calf cardiac valvular endothelial cells in culture: production of glycosaminoglycans, prostacyclin and fibronectin. *J Mol Cell Cardiol*, 20 (2):103-118.
- Mason RA, Hui JC, Campbell R, Giron F. 1987. The effects of endothelial injury on smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Surg*, 5 (2):389-392.
- Mehta D, George SJ, Jeremy JY, Izzat MB, Southgate KM, Bryan AJ, Newby AC, Angelini GD. 1998. External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting. *Nat Med*, 4 (2):235-239.
- Messier RH, Jr., Bass BL, Aly HM, Jones JL, Domkowski PW, Wallace RB, Hopkins RA. 1994. Dual structural and functional phenotypes of the porcine aortic valve interstitial population: characteristics of the leaflet myofibroblast. *J Surg Res*, 57 (1):1-21.
- Metz R, Teijink JA, van de Pavoordt HD, Ackerstaff RG, de Borst GJ, Kelder JC, Moll FL. 2002. Carotid endarterectomy in octogenarians with symptomatic high-grade internal carotid artery stenosis: long-term clinical and duplex follow-up. *Vasc Endovascular Surg*, 36 (6):409-414.
- Minuth WW, Schumacher K, Strehl R, Kloth S. 2000. Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*, 11 (5):495-522.
- Miyata T, Conte MS, Trudell LA, Mason D, Whittemore AD, Birinyi LK. 1991. Delayed exposure to pulsatile shear stress improves retention of human saphenous vein endothelial cells on seeded ePTFE grafts. *J Surg Res*, 50 (5):485-493.

- Moses MA, Shing Y. 1994. Production of matrix metalloproteinases and a metalloproteinase inhibitor by swarm rat chondrosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 199 (1):418-424.
- Murata K. 1981. Acidic glycosaminoglycans in human heart valves. *J Mol Cell Cardiol*, 13 (3):281-292.
- Nerem RM, Seliktar D. 2001. Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, 3:225-243.
- Newby AC, Zaltsman AB. 2000. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol*, 190 (3):300-309.
- Niklason LE, Ratcliffe A, Brockbank K, Bruley DF, Kang KA. 2002. Bioreactors and bioprocessing: breakout session summary. *Ann N Y Acad Sci*, 961:220-222.
- Opitz F, Schenke-Layland K, Cohnert TU, Starcher B, Halbhuber KJ, Martin DP, Stock UA. 2004. Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis in vivo. *Cardiovasc Res*, 63 (4):719-730.
- Perry TE, Kaushal S, Sutherland FW, Guleserian KJ, Bischoff J, Sacks M, Mayer JE. 2003. Thoracic Surgery Directors Association Award. Bone marrow as a cell source for tissue engineering heart valves. *Ann Thorac Surg*, 75 (3):761-767; discussion 767.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284 (5411):143-147.
- Putnam AJ, Mooney DJ. 1996. Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. *Nat Med*, 2 (7):824-826.

- Rabkin E, Schoen FJ. 2002. Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol*, 11 (6):305-317.
- Rabkin E, Hoerstrup SP, Aikawa M, Mayer JE, Jr., Schoen FJ. 2002. Evolution of cell phenotype and extracellular matrix in tissue-engineered heart valves during in-vitro maturation and in-vivo remodeling. *J Heart Valve Dis*, 11 (3):308-314; discussion 314.
- Rafii S. 2000. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest*, 105 (1):17-19.
- Ratcliffe A, Niklason LE. 2002. Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci*, 961:210-215.
- Rezai N, Podor TJ, McManus BM. 2004. Bone marrow cells in the repair and modulation of heart and blood vessels: emerging opportunities in native and engineered tissue and biomechanical materials. *Artif Organs*, 28 (2):142-151.
- Rice NA, Leinwand LA. 2003. Skeletal myosin heavy chain function in cultured lung myofibroblasts. *J Cell Biol*, 163 (1):119-129.
- Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, Weigel G. 2004. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127 (2):399-405.
- Rieder E, Seebacher G, Kasimir MT, Eichmair E, Winter B, Dekan B, Wolner E, Simon P, Weigel G. 2005. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. *Circulation*, 111 (21):2792-2797.
- Romeis, B. 1989. *Mikroskopische Technik*, 17. Aufl. München - Wien Baltimore: Verlag Urban und Schwarzenberg.

- Rothenburger M, Volker W, Vischer P, Glasmacher B, Scheld HH, Deiwick M. 2002. Ultrastructure of proteoglycans in tissue-engineered cardiovascular structures. *Tissue Eng*, 8 (6):1049-1056.
- Roy A, Brand NJ, Yacoub MH. 2000. Molecular characterization of interstitial cells isolated from human heart valves. *J Heart Valve Dis*, 9 (3):459-464; discussion 464-455.
- Sanders EA, Hoeneveld H, Eikelboom BC, Ludwig JW, Vermeulen FE, Ackerstaff RG. 1987. Residual lesions and early recurrent stenosis after carotid endarterectomy. A serial follow-up study with duplex scanning and intravenous digital subtraction angiography. *J Vasc Surg*, 5 (5):731-737.
- Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, Wahlers T, Stock UA. 2003a. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol*, 143 (3):201-208.
- Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, Döring C, Halbhuber KJ, Schirrmeyer F, Wahlers T, Stock UA. 2003b. Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study. *Cardiovasc Res*, 60 (3):497-509.
- Schneider PJ, Deck JD. 1981. Tissue and cell renewal in the natural aortic valve of rats: an autoradiographic study. *Cardiovasc Res*, 15 (4):181-189.
- Schnell AM, Hoerstrup SP, Zund G, Kolb S, Sodian R, Visjager JF, Grunenfelder J, Suter A, Turina M. 2001. Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardiovasc Surg*, 49 (4):221-225.
- Schoen FJ. 1997. Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. *J Heart Valve Dis*, 6 (1):1-6.

- Schoen FJ. 1999. Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology. *J Heart Valve Dis*, 8 (4):350-358.
- Schoen FJ, Levy RJ. 1999. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res*, 47 (4):439-465.
- Schurch W, Seemayer TA, Lagace R, Gabbiani G. 1984. The intermediate filament cytoskeleton of myofibroblasts: an immunofluorescence and ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 403 (4):323-336.
- Schwartz RS, Holmes DR, Jr., Topol EJ. 1992. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol*, 20 (5):1284-1293.
- Scott M, Vesely I. 1995. Aortic valve cusp microstructure: the role of elastin. *Ann Thorac Surg*, 60 (2 Suppl):S391-394.
- Scott MJ, Vesely I. 1996. Morphology of porcine aortic valve cusp elastin. *J Heart Valve Dis*, 5 (5):464-471.
- Shi Q, Wu MH, Hayashida N, Wechezak AR, Clowes AW, Sauvage LR. 1994. Proof of fall out endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg*, 20 (4):546-556; discussion 556-547.
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. 1998. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92 (2):362-367.
- Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. 1997. Tissue-engineered heart valve leaflets: does cell origin affect outcome? *Circulation*, 96 (9 Suppl):II-102-107.

- Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. 1995. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg*, 60 (6 Suppl):S513-516.
- Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. 2002. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*, 106 (10):1199-1204.
- Slomp J, van Munsteren JC, Poelmann RE, de Reeder EG, Bogers AJ, Gittenberger-de Groot AC. 1992. Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for vascular intimal thickening. An immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. *Atherosclerosis*, 93 (1-2):25-39.
- Smith JA, Radomski MW, Schulz R, Moncada S, Lewis MJ. 1993. Porcine ventricular endocardial cells in culture express the inducible form of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, 108 (4):1107-1110.
- Sodian R, Loebe M, Hein A, Martin DP, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Lueth T, Hetzer R. 2002. Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. *Asaio J*, 48 (1):12-16.
- Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, Kim BS, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. 2000. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation*, 102 (19 Suppl 3):III22-29.
- Spina M, Ortolani F, Messleman AE, Gandaglia A, Bujan J, Garcia-Honduvilla N, Vesely I, Gerosa G, Casarotto D, Petrelli L, Marchini M. 2003. Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprotheses: extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features. *J Biomed Mater Res A*, 67 (4):1338-1350.
- Stanley JC, Burkel WE, Ford JW, Vinter DW, Kahn RH, Whitehouse WM, Jr., Graham LM. 1982. Enhanced patency of small-diameter, externally supported Dacron iliofemoral grafts seeded with endothelial cells. *Surgery*, 92 (6):994-1005.

- Statistisches Bundesamt, Hrsg. 2004. Pressemitteilung vom 27. Januar 2004.
<http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2004/p0410092.htm>
- Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A. 2000. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*, 102 (19 Suppl 3):III50-55.
- Stock UA, Schenke-Layland K. 2006. Performance of decellularized xenogeneic tissue in heart valve replacement. *Biomaterials*, 27 (1):1-2.
- Stock UA, Vacanti JP, Mayer Jr JE, Wahlers T. 2002. Tissue engineering of heart valves -- current aspects. *Thorac Cardiovasc Surg*, 50 (3):184-193.
- Stock UA, Wiederschain D, Kilroy SM, Shum-Tim D, Khalil PN, Vacanti JP, Mayer JE, Jr., Moses MA. 2001. Dynamics of extracellular matrix production and turnover in tissue engineered cardiovascular structures. *J Cell Biochem*, 81 (2):220-228.
- Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, Moran A, Lien J, Martin DP, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. 2000. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 119 (4 Pt 1):732-740.
- Taylor PM, Allen SP, Yacoub MH. 2000. Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. *J Heart Valve Dis*, 9 (1):150-158.
- Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. 1988. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg*, 23 (1 Pt 2):3-9.
- Vesely I. 1998. The role of elastin in aortic valve mechanics. *J Biomech*, 31 (2):115-123.

- Vesely I. 2005. Heart valve tissue engineering. *Circ Res*, 97 (8):743-755.
- Vesely I, Noseworthy R. 1992. Micromechanics of the fibrosa and the ventricularis in aortic valve leaflets. *J Biomech*, 25 (1):101-113.
- Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, Jeremy JY. 2004. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg*, 40 (5):1011-1019.
- Vongpatanasin W, Hillis LD, Lange RA. 1996. Prosthetic heart valves. *N Engl J Med*, 335 (6):407-416.
- Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF. 1997. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem*, 67 (4):478-491.
- Wagner DD, Marder VJ. 1984. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *J Cell Biol*, 99 (6):2123-2130.
- Waller JR, Brook NR, Bicknell GR, Nicholson ML. 2004. Differential effects of modern immunosuppressive agents on the development of intimal hyperplasia. *Transpl Int*, 17 (1):9-14.
- Weiser MC, Majack RA, Tucker A, Orton EC. 1995. Static tension is associated with increased smooth muscle cell DNA synthesis in rat pulmonary arteries. *Am J Physiol*, 268 (3 Pt 2):H1133-1138.
- Weston MW, LaBorde DV, Yoganathan AP. 1999. Estimation of the shear stress on the surface of an aortic valve leaflet. *Ann Biomed Eng*, 27 (4):572-579.

- Yacoub MH, Kilner PJ, Birks EJ, Misfeld M. 1999. The aortic outflow and root: a tale of dynamism and crosstalk. *Ann Thorac Surg*, 68 (3 Suppl):S37-43.
- Yang YM, Moussa I. 2005. Percutaneous coronary intervention and drug-eluting stents. *Cmaj*, 172 (3):323-325.
- Zacks S, Rosenthal A, Granton B, Havenith M, Opas M, Gotlieb AI. 1991. Characterization of Cobblestone mitral valve interstitial cells. *Arch Pathol Lab Med*, 115 (8):774-779.
- Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, Sibanda B. 2001. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng*, 7 (1):9-22.
- Zwolak RM, Adams MC, Clowes AW. 1987. Kinetics of vein graft hyperplasia: association with tangential stress. *J Vasc Surg*, 5 (1):126-136.

Anhang

Lebenslauf

Allgemeines

Name: Thomas Schulz
Anschrift: Dr. Löffler Str. 25
06628 Bad Kösen

Geburtsdatum/-ort: 03. Juli 1980 in Forst (Lausitz)
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1987 - 1991 Grundschule in Bad Kösen
1991 - 1995 Domgymnasium in Naumburg
1995 - 1999 Landesschule Pforta
1999 Abschluss mit dem Abitur

Wehrdienst

Nov. 1999 - Aug. 2000 Sanitätsdienst der Bundeswehr

Studium

Okt. 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Stipendien/Förderungen

1996 - 1999 Stipendiat der Melanchthon-Stiftung
2003 - 2004 Förderstipendium des Fördervereins des Klinikums der
Friedrich-Schiller-Universität Jena e.V., gestiftet von der
AJZ-Engineering GmbH

Jena, den 10. Mai 2006

Thomas Schulz

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. Ulrich A. Stock für die Überlassung dieses überaus interessanten und aufregenden Themas und die dauerhafte Unterstützung, die mir vom ersten Tag an entgegengebracht worden ist, bedanken. Seine offene, unkomplizierte Art und seine stets optimistische Einstellung haben mir bei der Durchführung dieser Arbeit sehr geholfen. Ein großes Dankeschön geht auch an Frau Astrid Stock für das ausdauernde Korrekturlesen.

Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe. Ich danke Frau Dr. Schenke-Layland für die konstruktiven Anregungen und Diskussionen, sowie für die Erläuterungen zu den von ihr geleisteten Vorarbeiten. Ich danke Frau Claudia Döring für die Einweisung in die notwendigen Präparations- und Zellkulturtechniken, sowie für die Anleitung und Betreuung bei meinen ersten „Gehversuchen“. Für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor und der Vorbereitung und Durchführung der *in vivo* Versuche möchte ich mich besonders bei Frau Ilka Degenkolbe bedanken.

Frau Prof. Dr. Tina Cohnert und Herrn Dr. Raimund Bruhin danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der anspruchsvollen Eingriffe.

Ich danke Dr. Schubert und seinen Mitarbeitern vom Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena für die gute Zusammenarbeit während der Operationen und bei der Betreuung der Versuchstiere. Ein besonderes Dankeschön geht dabei an Herrn Dr. Thomas Müller für die Durchführung der Anästhesie.

Herrn Prof. Dr. Karl-Jürgen Halbhuber danke ich für die hervorragende Kooperation mit dem Institut für Anatomie II und dem Elektronenmikroskopischen Zentrum. Dabei möchte ich mich besonders bei Frau Sabine Hitschke für die flexible und verlässliche Zusammenarbeit bei der Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Arbeiten bedanken. Ebenso danke ich Frau Dipl. Ing. Ingemarie Herrmann für die kompetente Unterstützung bei der Arbeit am Rasterelektronenmikroskop.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Günther Sammler als Vertreter der Mitarbeiter der Zentralwerkstatt des Klinikums der FSU Jena.

Meinen Eltern danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die nicht nur in finanzieller Hinsicht geleistete Unterstützung während meines Studiums. Auch meinen Großeltern möchte ich an dieser Stelle danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Anne Dochow. Ihre moralische Unterstützung, der Zuspruch und Rückhalt, vor allem während der schwierigen Phasen, hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dem Förderverein des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena e.V., sowie der AJZ Engineering GmbH möchte ich für die Unterstützung meiner Dissertation durch ein Forschungsstipendium danken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:
Herr PD Dr. Ulrich A. Stock, Frau Dr. Katja Schenke-Layland
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 10. Mai 2006

Thomas Schulz, Verfasser